

BEST AVAILABLE COPY

PCT/CN03/00792

# 证 明

REC'D 25 NOV 2003

WIPO

PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 09 18

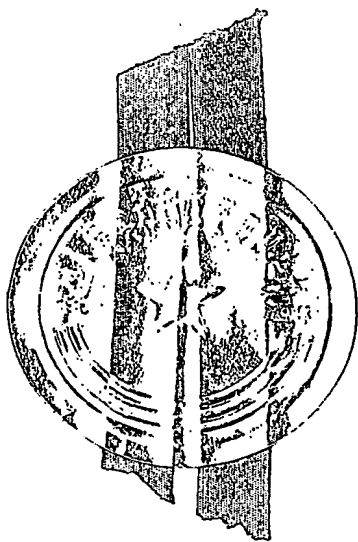
申 请 号： 02 1 30738.5

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 用于生产治疗用乙型肝炎疫苗或药物的免疫原及其制备方法和用途

申 请 人： 中国人民解放军免疫学研究所；重庆佳辰生物工程有限公司

发明人或设计人： 吴玉章；边疆；周伟；贾正才；石统东；邹丽云



**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国  
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 10 月 8 日

## 权 利 要 求 书

1. 一种免疫原，其特征在于该免疫原含有一个多肽序列，该多肽序列含有氨基酸序列 1、氨基酸序列 2 和氨基酸序列 3，其中氨基酸序列 1、氨基酸序列 2 与氨基酸序列 3 之间分别由若干个氨基酸残基组成的连接肽段共价连接；所述氨基酸序列 1 是 Th 细胞表位序列；所述氨基酸序列 2 是乙型肝炎病毒来源的 CTL 表位序列；所述氨基酸序列 3 是乙型肝炎病毒来源的 B 细胞表位序列。
2. 根据权利要求 1 所述的免疫原，其特征在于所述氨基酸序列 1 是破伤风类毒素来源的 Th 细胞表位上的第 830-843 氨基酸序列或其变异序列、通用 Th 细胞表位 PADRE；所述氨基酸序列 2 是：HBV 核心抗原上第 18-27 氨基酸序列或其变异序列、141-151 氨基酸序列或其变异序列、117-125 氨基酸序列或其变异序列、88-94 氨基酸序列或其变异序列、88-96 氨基酸序列或其变异序列，HBV 表面抗原上第 183-191 氨基酸序列或其变异序列、201-210 氨基酸序列或其变异序列、204-212 氨基酸序列或其变异序列、370-379 氨基酸序列或其变异序列、251-259 氨基酸序列或其变异序列、260-269 氨基酸序列或其变异序列、335-343 氨基酸序列或其变异序列、338-347 氨基酸序列或其变异序列、348-357 氨基酸序列或其变异序列、378-387 氨基酸序列或其变异序列，Pre S1 抗原上第 10-17 氨基酸序列或其变异序列，Pre S2 抗原上第 109-123 氨基酸序列或其变异序列、抗原上第 152-161 氨基酸序列或其变异序列，HBx 抗原上第 92-100 氨基酸序列或其变异序列、99-108 氨基酸序列或其变异序列、115-123 氨基酸序列或其变异序列、133-141 氨基酸序列或其变异序列，Pol 抗原上第 61-69 氨基酸序列或其变异序列、455-463 氨基酸序列或其变异序列、575-583 氨基酸序列或其变异序列、773-782 氨基酸序列或其变异序列、803-811 氨基酸序列或其变异序列、756-764 氨基酸序列或其变异序列、816-824 氨基酸序列或其变异序列、655-663 氨基酸序列或其变异序列、551-559 氨基酸序列或其变异序列、772-780 氨基

酸序列或其变异序列、502-510 氨基酸序列或其变异序列、538-546 氨基酸序列或其变异序列、642-650 氨基酸序列或其变异序列、646-654 氨基酸序列或其变异序列；所述氨基酸序列 3 是 HBV Pre-S2 来源的 B 细胞表位上的第 14-24 氨基酸序列或其变异序列、HBS 抗原上 a 决定簇。

3. 根据权利要求 1 或 2 中任一项权利要求所述的免疫原，其特征在于所述氨基酸序列 1 是 QYIKANSKFIGITE 或其变异序列、PADRE 或其变异序列；所述氨基酸序列 2 是：PLGFFPDH 或其变异序列、MQWNSTALHQALQDP 或其变异序列、SILSKTGDPV 或其变异序列、VI.QAGFFLL 或其变异序列、FLLTRILTI 或其变异序列、FLGGTPVCL 或其变异序列、LLCLIFLLV 或其变异序列、LLDYQGMLPV 或其变异序列、WLSLLVPFV 或其变异序列、GLSPTVWLSV 或其变异序列、KVLHKRTLGL 或其变异序列、VLHKRTLGL 或其变异序列、GLSAMSTTDL 或其变异序列、CLFKDWEEL 或其变异序列、VLGGCRHKL 或其变异序列、FLPSDFFPSV 或其变异序列、STLPETTVVRR 或其变异序列、EYLVSFQVW 或其变异序列、GLYSSTVPV 或其变异序列、GLSRYVARL 或其变异序列、FLLSLGIHL 或其变异序列、ILRGTSFVYV 或其变异序列、SLYADSPSV 或其变异序列、KYTSFPWLL 或其变异序列、SLYADSPSV 或其变异序列、ALMPYACI 或其变异序列、YMDDVVLGA 或其变异序列、WILRGTSFV 或其变异序列、KLHLYSHPI 或其变异序列、FTQAGYPAL 或其变异序列、SLNFLGGTTV 或其变异序列、LLDYQGMLPV 或其变异序列、LLVPFVQWFV 或其变异序列、GLSPTVWLSV 或其变异序列、LLPIFFCLWV 或其变异序列、YVNTNMG 或其变异序列、YVNTNMGLK 或其变异序列、SILSKTGDPV 或其变异序列、GLSPTVWLSV 或其变异序列、SIVSPFIPLL 或其变异序列；所述氨基酸序列 3 是 DPRVRGLYFPA 或其变异序列、CTKPTDGNCT 或其变异序列。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项权利要求所述的免疫原，其特征在于所述连接肽段是由三至七个氨基酸残基组成。
5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项权利要求所述的免疫原，其特征在于所述连接肽段是 AAA、SSS 或 GGG。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项权利要求所述的免疫原, 其特征在于氨基酸序列 1、氨基酸序列 2 与氨基酸序列 3 之间的连接次序是: 氨基酸序列 1-氨基酸序列 2-氨基酸序列 3, 氨基酸序列 1-氨基酸序列 3-氨基酸序列 2, 氨基酸序列 2-氨基酸序列 1-氨基酸序列 3, 氨基酸序列 2-氨基酸序列 3-氨基酸序列 1, 氨基酸序列 3-氨基酸序列 1-氨基酸序列 2, 或氨基酸序列 3-氨基酸序列 2-氨基酸序列 1。
7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项权利要求所述的免疫原, 其特征在于所述免疫原还含有若干个修饰基团, 该修饰基团是烷基羰基、链烯基羰基。
8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项权利要求所述的免疫原, 其特征在于所述免疫原含有两个修饰基团。
9. 根据权利要求 1 至 7 中任一项权利要求所述的免疫原, 其特征在于所述免疫原含有一个修饰基团。
10. 根据权利要求 7 至 9 中任一项权利要求所述的免疫原, 其特征在于所述烷基羰基选自由  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$  和  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$  组成的一组烷基羰基中的一个至五个; 所述链烯基羰基选自由  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$  和  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$  组成的一组链烯基羰基中的一个至五个。
11. 根据权利要求 7 至 10 中任一项权利要求所述的免疫原, 其特征在于所述修饰基团与所述多肽序列的任意一个氨基酸残基共价连接。
12. 根据权利要求 7 至 11 中任一项权利要求中所述的免疫原, 其特征在于所述修饰基团与所述多肽序列的 N 末端  $\alpha$  氨基、C 末端  $\alpha$  羧基或氨基酸残基的任何一个侧链基团共价连接。
13. 根据权利要求 12 中所述的免疫原, 其特征在于所述修饰基团与所述多肽序列的 N 末端  $\alpha$  氨基之间通过连接肽段 KSS 连接, 其中, 所述多肽序列的 N 末端  $\alpha$  氨基与连接肽段 KSS 的 C 末端通过肽键连接, 所述修饰基团与连接肽段 KSS 的  $\epsilon$  氨基共价连接。
14. 根据权利要求 12 或 13 中任一项权利要求所述的免疫原, 其特征在于

于所述修饰基团与所述侧链基团上的氨基、羧基或羟基等基团共价连接。

15. 根据权利要求 12 所述的免疫原, 其特征在于所述修饰基团与 N 末端赖氨酸的 $\epsilon$ 氨基共价连接。

16. 根据权利要求 13 中所述的免疫原, 其特征在于所述连接肽段 KSS 的 $\alpha$ 氨基上还共价连接一个所述的修饰基团。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是

$CH_3(CH_2)_{10}CO$  KSSPADREGGSLNFLGGTTVSSSDPRVRGLYFPA。

18. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  
 $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAALLCLIFLLVGGGDPRVRGLYFPA$ 。

19. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAALLDYQGMLPVGGGDPRVRGLYFPA$ 。

20. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)-$

$CO, CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2), CO, KSSQYIKANSKFIGITEGGGDPRVRGLYFPA$ 。

21. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  
 $CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2), COFLPSDFFPSVAAADPRVRGLYFPA$ 。

22. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  
 $CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2), COKSSPADREGGWLSLLVPFVSSSDPRVRGLYFPA$ 。

23. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAFLPSDFFPSVGGGDPRVRGLYFPA$ 。

24. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREAAFLPSDFFPSVGGGDPRVRGLYFPA$ 。

25. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREGGGLLVFVQWFVSSSDPRVRGLYFPA$ 。

26. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{14}COKSSPADREAAAGLSPTVWLSVGGGDPRVRGLYFPA$ 。
27. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{16}COKSSPADREAAA LLPIFFCLWVGGGDPRVRGLYFPA$ 。
28. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{16}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAYVNTNMGGGDPRVRGLYFPA$ 。
29. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  
 $CH_3 (CH_2)_{16}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$ 。
30. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEGGGFLPSDFPSVSSSDPRVRGLYFPA$ 。
31. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAA YVNTNMGLK GGGDPRVRGLYFPA$ 。
32. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAA PLGFFPDH GGGDPRVRGLYFPA$ 。
33. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAMQWNSTALHQALQDPGGGDPRVRGLYFPA$ 。
34. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{14}COKSSPDAREAAASILSKTGDVPVGGGDPRVRGLYFPA$ 。
35. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{16}COKSSPADREAAAVLQAGFFLLGGGDPRVRGLYFPA$ 。
36. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{16}COKSSPADRESSSFLTRILTIGGGDPRVRGLYFPA$ 。
37. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{16}COKSSPADREAAAFLLGGTPVCLGGGDPRVRGLYFPA$ 。
38. 根据权利要求 1-16 中所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAGLSPTVWLSVGGGDPRVRGLYFPA$ 。
39. 如权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  $CH_3 (CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAASIVSPFIPLLGGGDPRVRGLYFPA$ 。
40. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原, 其特征在于一级结构是

CH<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub> COKSSPADREAAASTLPETTVVRRGGGDPRVRGLYFPA.

41. 根据权利要求 1-16 中所述的免疫原, 其特征在于一级结构是  
CH<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub> COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGCTKPTDGNCT.
42. 一种设计、筛选和合成权利要求 1 至 41 中任一项权利要求所述的免疫原的方法, 包括基于表位的疫苗设计 (EBVD), 分子模拟、分子设计、筛选体系和多肽固相合成, 其中多肽固相合成中树脂与每种氨基酸或棕榈酸投料的摩尔比为 1: 2-1: 8, 精氨酸、天冬酰胺以及棕榈酸组分的连接采用双偶联, 反应温度为 20-40℃.
43. 根据权利要求 42 所述的方法, 其中所述投料的摩尔比为 1: 4, 所述反应温度为 30℃.
44. 一种制备权利要求 1 至 41 中任一项权利要求所述免疫原的方法, 其特征在于该方法包括以下步骤: (1) 多肽固相合成所述免疫原-树脂, 所述免疫原-树脂表示与树脂结合的免疫原; (2) 对免疫原-树脂进行裂解, 得到裂解液; (3) 将步骤 (2) 的裂解液采用体积排阻层析进行初步分离纯化; (4) 通过反相层析纯化得到免疫原.
45. 根据权利要求 44 所述的方法, 其特征在于所述步骤 (2) 选用 TFA 裂解液; 裂解条件是免疫原-树脂的浓度: 小于 100 mg/ml, 反应温度: 15-50℃, 反应时间: 0.5-3 小时.
46. 根据权利要求 44 或 45 中任一项权利要求所述的方法, 其特征在于所述 TFA 裂解液为: 0.75 g 苯酚、0.25 ml 乙二硫醇、0.5 ml 苯甲硫醚、0.5 ml 去离子水、10.0 ml TFA; 所述裂解条件是免疫原-树脂的浓度: 40.00 mg/ml, 反应温度: 25℃, 反应时间: 1.5 小时.
47. 根据权利要求 44 所述的方法, 其特征在于所述步骤 (3) 中的体积排阻层析采用的柱填料为 Sephadex LH20, 流动相为二甲基亚砷.
48. 根据权利要求 44 所述的方法, 其特征在于所述步骤 (4) 中的反相层析采用的柱填料为 POROS 50 R1、POROS 50 R2、SOURCE 30 RPC 或 Delta Pak C18.
49. 根据权利要求 44 或 47 中任一项权利要求所述的方法, 其特征在于

所述步骤(4)中的反相层析采用梯度洗脱,流动相采用乙腈/TFA、乙腈/HCl、乙醇/TFA、乙醇/HCl或乙醇/磷酸的水溶液。

50. 根据权利要求44或47或48中任一项权利要求所述的方法,其特征在于所述反相层析纯化的柱温是20-60℃。
51. 根据权利要求50所述的方法,其特征在于所述反相层析纯化的柱温是28-40℃。
52. 根据权利要求51所述的方法,其特征在于所述反相层析纯化的柱温是32-36℃。
53. 根据权利要求52所述的方法,其特征在于所述反相层析纯化的柱温是34℃。
54. 根据权利要求1至41中任一项权利要求所述的免疫原在制备治疗HBV慢性感染持续状态及其相关的继发性肝硬化、肝癌等疾病的疫苗或药物的用途。
55. 根据权利要求54所述的用途,其特征在于所述HBV慢性感染持续状态为慢性乙型肝炎或乙型肝炎病毒携带者。
56. 一种治疗用乙型肝炎疫苗,其特征在于该疫苗含有权利要求1至41中任一项权利要求所述的免疫原。
57. 一种治疗用乙型肝炎疫苗,其特征在于该疫苗含有权利要求1至41中任一项权利要求所述的免疫原以及药学上可接受的辅料、佐剂和/或载体。
58. 权利要求56或57中任一项所述的治疗用乙型肝炎疫苗,其特征在于该疫苗是药学上可接受的任意一种剂型。
59. 根据权利要求56-58中任一项所述治疗用乙型肝炎疫苗,其特征在于该疫苗的制剂是注射剂、透皮剂、口服剂、吸入剂或栓剂。
60. 根据权利要求58所述的治疗用乙型肝炎疫苗,其特征在于该疫苗的剂型为液体剂型、混悬液剂型、液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型。
61. 根据权利要求60所述的治疗用乙型肝炎疫苗,其特征在于液体剂型为乙醇溶液剂型。
62. 根据权利要求60所述治疗用乙型肝炎疫苗,其特征在于所述液体



- 脂质体剂型或冻干脂质体剂型含有磷脂。
63. 根据权利要求 62 所述治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型还含有胆固醇。
64. 根据权利要求 62 或 63 中任一项所述治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型还含有维生素 E。
65. 根据权利要求 62 至 64 中任一项所述治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型还含有棕榈酸。
66. 根据权利要求 60 或 65 中任一项权利要求所述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗中的免疫原、磷脂、胆固醇、维生素 E 和棕榈酸的摩尔比为 0.1-0.5: 40-80: 0-40: 0-10: 0-10。
67. 根据权利要求 66 所述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗中的免疫原、磷脂、胆固醇、维生素 E 和棕榈酸的摩尔比为 0.2-0.4: 60: 20: 6: 6。
68. 根据权利要求 67 所述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗中的免疫原、磷脂、胆固醇、维生素 E 和棕榈酸的摩尔比为 0.3-0.36: 60: 20: 6: 6。
69. 权利要求 60 或 62 中任一项所述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述磷脂为大豆磷脂或卵磷脂。
70. 根据权利要求 60 或 62 任一项所述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述冻干脂质体剂型还含有人白蛋白、甘露醇和磷酸盐。
71. 根据权利要求 60 或 62-71 中任何一项所述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述冻干脂质体剂型含权利要求 1 至 41 所述免疫原、磷脂、胆固醇、棕榈酸、维生素 E、甘露醇、人血白蛋白、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，其摩尔比为 0.01-0.1: 5-15: 1-7: 0.5-1.5: 0.5-1.5: 70-150: 0.1-0.3: 1-10: 1-10。
72. 一种制备权利要求 60 或 62 任一项权利要求所述的治疗用乙型肝炎疫苗的方法，其特征在于所述方法包括采用二次乳化法制备脂质体。

用于生产治疗用乙型肝炎疫苗或药物的免疫原及其制备方法和用途

## 技术领域

本发明涉及乙型肝炎治疗用免疫原及其制备方法和应用，以及含有该免疫原的乙型肝炎疫苗或药物及其生产方法和应用。

## 背景技术

乙型病毒性肝炎是一种全球性疾病。据 WHO 报告：全球乙型肝炎病毒感染者约占人群的 30%，约 18 亿；慢性感染者约 0.35 亿。后者表现为持续性病毒血症，其病毒水平是爱滋病毒（HIV）和丙肝病毒（HCV）的 100-1000 倍以上。在全球范围内，中国属高流行区，乙型肝炎病毒携带者约占人口的 10%（1.2 亿）、慢性肝炎患者约 0.3 亿。乙型病毒性肝炎多为围产期传播、青春期发病、青壮年恶化。因此，其危害的人群多为青壮年。大部分病人感染后通过自然病程痊愈，而部分病人则迁延不愈并发展为肝硬化、肝癌。据估计全球每年至少有 50 万慢性感染患者死于肝硬化和肝癌。乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）是已知仅次于烟草的人类致癌原。

目前，控制乙型肝炎流行的主要手段是由 WHO 推行的全球免疫接种计划。但是由于：（1）该计划采用的预防性疫苗，对已感染者无效；（2）在未感染的新生儿人群，有 5-15% 不应答；（3）接种普及率仍不高，具 1999 年的统计，全球高发区新生儿的接种率只有 62%。因此，在今后一个相当长的时期内，乙型肝炎仍将是危害人类健康的重要问题之一。

HBV 核心抗原（HBcAg）在肝癌及其癌旁组织中的阳性率分别为 62.5% 和 29.2%。目前已证实：（1）HBV 作为一种嗜肝病毒，并不能直接引起肝细胞损伤，其感染的病理和临床后果取决于免疫机制。（2）作为细胞内感染，慢性持续性感染状态主要与机体细胞免疫应答太弱有关。其中，HBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte, CTL）反应决定了 HBV 感染的最终结果。感染 HBV 后 CTL 活性高者体内病毒

被清除而痊愈；CTL 活性低或测不到的感染者则发展为慢性持续感染状态，并进一步发展为肝硬化或/和肝癌。因此，克服 HBV 持续感染患者的免疫耐受状态，在体启动 HBV 特异性 CTL 反应，可治疗 HBV 慢性感染持续状态及防止其相关的继发性肝硬化、肝癌等疾病。

5 美国 Scripps 研究所的 F V Chisari 在自己研究的基础上分别申请了 4 项美国专利（专利号 US6235288, US5932224, US5840303US, US5788969）。这些专利的主要内容均是关于在 HBV 抗原上所确定的 CTL 表位，这些表位分别来源于核心抗原、表面抗原、多聚酶和 X 抗原。这些部位或结构，是 HBV 所诱导的 CTL 所识别的部位。中国江西南昌  
10 医学院申请了一种含 Pre-S2 和 HBsAg 的质粒 DNA 疫苗，以激发细胞免疫和体液免疫反应，用于乙型肝炎的预防和治疗。

当前，对 HBV 慢性持续感染状态（包括病毒携带者、慢性迁延性肝炎和慢性活动性肝炎）尚无特效治疗手段。干扰素（IFN- $\alpha$  /  $\beta$  , IFN- $\gamma$ ）及肿瘤坏死因子（TNF- $\alpha$ ）被证明能下调感染细胞 HBV 的复制和基因表  
15 达，它对复制中的 DNA 中间体和转录模板等具有敏感性，但并不能清除病毒。拉米呋定（3TC）是第一个用于临床的核苷类抗病毒复制药物，能减低病毒血症达 2 倍 log。但却很难清除病毒，因为 e 抗原阳性携带者的血清中病毒滴度达  $10^8$  以上。实际上，临床研究也未发现 HBsAg 转阴的经治病人。因此，急需发展有效治疗 HBV 慢性持续感染状态的手  
20 段。

### 本发明的概述

本发明的第一个目的在于提供一种能诱导 HBV 特异性 CTL 的免疫原，以及含有该免疫原的治疗用乙型肝炎疫苗；

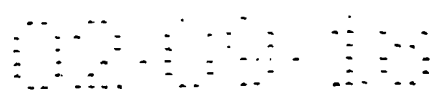
25 本发明本发明的第二个目的在于提供了所述免疫原的制备方法和所述治疗用乙型肝炎疫苗的制备方法；

本发明第三个目的在于提供了所述免疫原用于制备治疗用乙型肝炎疫苗或药物的用途；

30 本发明另一目的是提供了所述免疫原用于制备治疗 HBV 慢性感染持续状态及其相关的继发性肝硬化、肝癌等疾病的疫苗或药物的应用。

### 本发明的详细描述

24



本发明提供了以下几方面的内容:

一种免疫原, 其特征在于该免疫原含有一个多肽序列, 该多肽序列含有氨基酸序列 1、氨基酸序列 2 和氨基酸序列 3, 其中氨基酸序列 1、氨基酸序列 2 与氨基酸序列 3 之间分别由若干个氨基酸残基组成的连接肽段共价连接, 所述氨基酸序列 1 是 Th 细胞表位序列, 所述氨基酸序列 2 是乙型肝炎病毒来源的 CTL 表位序列, 所述氨基酸序列 3 是乙型肝炎病毒来源的 B 细胞表位序列。

上述氨基酸序列 1 是破伤风类毒素来源的 Th 细胞表位上的第 830-843 氨基酸序列或其变异序列、通用 Th 细胞表位 PADRE; 所述氨基酸序列 2 是: HBV 核心抗原上第 18-27 氨基酸序列或其变异序列、141-151 氨基酸序列或其变异序列、117-125 氨基酸序列或其变异序列、88-94 氨基酸序列或其变异序列、88-96 氨基酸序列或其变异序列, HBV 表面抗原上第 183-191 氨基酸序列或其变异序列、201-210 氨基酸序列或其变异序列、204-212 氨基酸序列或其变异序列、370-379 氨基酸序列或其变异序列、251-259 氨基酸序列或其变异序列、260-269 氨基酸序列或其变异序列、335-343 氨基酸序列或其变异序列、338-347 氨基酸序列或其变异序列、348-357 氨基酸序列或其变异序列、378-387 氨基酸序列或其变异序列; Pre S1 抗原上第 10-17 氨基酸序列或其变异序列, Pre S2 抗原上第 109-123 氨基酸序列或其变异序列、抗原上第 152-161 氨基酸序列或其变异序列; HBx 抗原上第 92-100 氨基酸序列或其变异序列、99-108 氨基酸序列或其变异序列、115-123 氨基酸序列或其变异序列、133-141 氨基酸序列或其变异序列; Pol 抗原上第 61-69 氨基酸序列或其变异序列、455-463 氨基酸序列或其变异序列、575-583 氨基酸序列或其变异序列、773-782 氨基酸序列或其变异序列、803-811 氨基酸序列或其变异序列、756-764 氨基酸序列或其变异序列、816-824 氨基酸序列或其变异序列、655-663 氨基酸序列或其变异序列、551-559 氨基酸序列或其变异序列、772-780 氨基酸序列或其变异序列、502-510 氨基酸序列或其变异序列、538-546 氨基酸序列或其变异序列、642-650 氨基酸序列或其变异序列、646-654 氨基酸序列或其变异序列; 所述氨基酸序列 3 是 HBV Pre-S2 来源的 B 细胞表位上的第 14-24 氨基酸序列或其变异序列、HBS 抗原上 a 决定簇。

15

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

上述氨基酸序列 1 是 QYIKANSKFIGITE 或其变异序列、PADRE 或其变异序列；所述氨基酸序列 2 是：PLGFFPDH 或其变异序列、MQWNSTALHQALQDP 或其变异序列、SILSKTGDPV 或其变异序列、VLQAGFFLL 或其变异序列、FLLTRILTI 或其变异序列、FLGGTPVCL 或其变异序列、LLCLIFLLV 或其变异序列、LLDYQGMLPV 或其变异序列、WLSLLVPFV 或其变异序列、GLSPTVWLSV 或其变异序列、KVLHKRTLGL 或其变异序列、VLHKRTLGL 或其变异序列、GLSAMSTTDL 或其变异序列、CLFKDWEEL 或其变异序列、VLGGCRHKL 或其变异序列、FLPSDFFPSV 或其变异序列、STLPETTVVRR 或其变异序列、EYLVSEFGVW 或其变异序列、GLYSSTVPV 或其变异序列、GLSRYVARL 或其变异序列、FLLSLGIHL 或其变异序列、ILRGTSFVYV 或其变异序列、SLYADSPSV 或其变异序列、KYTSFPWLL 或其变异序列、SLYADSPSV 或其变异序列、ALMPYACI 或其变异序列、YMDDVVLGA 或其变异序列、WILRGTSFV 或其变异序列、KLHLYSHPI 或其变异序列、FTQAGYPAL 或其变异序列、SLNFLGGTTV 或其变异序列、LLDYQGMLPV 或其变异序列、LLVPFVQWV 或其变异序列、GLSPTVWLSV 或其变异序列、LLPIFFCLWV 或其变异序列、YVNTNMG 或其变异序列、YVNTNMGK 或其变异序列、SILSKTGDPV 或其变异序列、GLSPTVWLSV 或其变异序列、SIVSPFIPLL 或其变异序列；所述氨基酸序列 3 是 DPRVRGLYFPA 或其变异序列、CTKPTDGNCT 或其变异序列。

上述免疫原，其特征在于所述连接肽段是由三至七个氨基酸残基组成。

上述免疫原，其特征在于所述连接肽段是 AAA、SSS 或 GGG。

上述的免疫原，其特征在于氨基酸序列 1、氨基酸序列 2 与氨基酸序列 3 之间的连接次序是：氨基酸序列 1-氨基酸序列 2-氨基酸序列 3，氨基酸序列 1-氨基酸序列 3-氨基酸序列 2，氨基酸序列 2-氨基酸序列 1-氨基酸序列 3，氨基酸序列 2-氨基酸序列 3-氨基酸序列 1，氨基酸序列 3-氨基酸序列 1-氨基酸序列 2，或着氨基酸序列 3-氨基酸序列 2-氨基酸序列 1。

上述免疫原，其特征在于所述免疫原还含有若干个修饰基团，该修饰基团是烷基羰基、链烯基羰基。

上述免疫原，其特征在于所述免疫原含有两个修饰基团。

上述免疫原，其特征在于所述免疫原含有一个修饰基团。

上述免疫原，其特征在于所述烷基羰基选自  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$  和  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$  组成的一组烷基羰基中的一个至五个；所述链烯基羰基选自  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$  和  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$  组成的一组链烯基羰基中的一个至五个。

上述免疫原，其特征在于所述修饰基团与所述多肽序列的任意一个氨基酸残基共价连接。

上述免疫原，其特征在于所述修饰基团与所述多肽序列的 N 末端  $\alpha$  氨基、C 末端  $\alpha$  羧基或氨基酸残基的任何一个侧链基团共价连接。

上述免疫原，其特征在于所述修饰基团与所述多肽序列的 N 末端  $\alpha$  氨基之间通过连接肽段 KSS 连接，其中，所述多肽序列的 N 末端  $\alpha$  氨基与连接肽段 KSS 的 C 末端通过肽键连接，所述修饰基团与连接肽段 KSS 的  $\epsilon$  氨基共价连接。

上述免疫原，其特征在于所述修饰基团与所述侧链基团上的氨基、羧基或羟基等基团共价连接。

上述免疫原，其特征在于所述修饰基团与 N 末端赖氨酸的  $\epsilon$  氨基共价连接。

上述免疫原，其特征在于所述连接肽段 KSS 的  $\alpha$  氨基上还共价连接一个所述的修饰基团。

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO KSSPADREGGSLNFLGGTTVSSSDPRVRGLYFPA}$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COKSSQYIKANSKFIGITEAAALLCLIFLLVGGGDPRVRGLYFPA}$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COKSSPADREAAALLDYQGMLPVGGGDPRVRGLYFPA}$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}, \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}, -$

$\text{KSSQYIKANSKFIGITEGGG}$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COFLPSDFFPSVAAADPRVRGLYFPA}$

17

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2)_7COKSSPADREGGGWLSLLVPFVSSSDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

5  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$

上述的免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREGGGLVPFVQWFVSSSDPRVRGLYFPA$

10 上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREAAAGLSPTVWLSVGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAALLPIFFCLWVGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

15  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAYVNTNMGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEGGGFLPSDFFPVSSSDPRVRGLYFPA$

20 上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAYVNTNMGLKGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAA PLGFFPDHGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

25  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAMQWNSTALHQALQDPGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSPDAREAAASILSKTGDPVGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAVLQAGFFLLGGGDPRVRGLYFPA$

30 上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADRESSSFLLTRILTIGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAFLGGTPVCLGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAGLSPTVWLSVGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

5  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAASIVSPFIPLLGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAASTLPETTVVRRGGGDPRVRGLYFPA$

上述免疫原，其特征在于一级结构是：

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAFLPSDFPSVGGGCTKPTDGNCT$

10

一种设计、筛选和合成上述的免疫原的方法，包括基于表位的疫苗设计（EBVD），分子模拟、分子设计、筛选体系和多肽固相合成，其中多肽固相合成中树脂与每种氨基酸或棕榈酸投料的摩尔比为 1: 2-1: 8，精氨酸、天酰胺以及棕榈酸组分的连接采用双偶联，反应温度为  
15 20-40℃。

上述投料的摩尔比为 1: 4，上述反应温度为 30℃。

一种制备上述免疫原的方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

（1）多肽固相合成所述免疫原-树脂，所述免疫原-树脂表示与树脂结合的免疫原；（2）对免疫原-树脂进行裂解，得到裂解液；（3）将步骤  
20 （2）的裂解液采用体积排阻层析进行初步分离纯化；（4）通过反相层析纯化得到免疫原。

如上述的方法，其特征在于所述步骤（2）选用 TFA 裂解液；裂解条件是免疫原-树脂的浓度：小于 100 mg/ml，反应温度：15-50℃，反应时间：0.5-3 小时。

如上述的方法，其特征在于所述 TFA 裂解液为：0.75 g 苯酚、0.25  
25 ml 乙二硫醇、0.5 ml 苯甲硫醚、0.5 ml 去离子水、10.0 ml TFA；所述裂解条件是免疫原-树脂的浓度：40.00 mg/ml，反应温度：25℃，反应时间：1.5 小时。

如上述的方法，其特征在于所述步骤（3）中的体积排阻层析采用的  
30 的柱填料为 Sephadex LH20，流动相为二甲基亚砜。

如上述的方法，其特征在于所述步骤（4）中的反相层析采用的柱填料为 POROS 50 R1、POROS 50 R2、SOURCE 30 RPC 或 Delta Pak C18。



如上述的方法，其特征在于所述步骤（4）中的反相层析采用梯度洗脱，流动相采用乙腈/TFA、乙腈/HCl、乙醇/TFA、乙醇/HCl 或乙醇/磷酸的水溶液。

如上述的方法，其特征在于所述反相层析纯化的柱温是 20-60℃。

5 如上述的方法，其特征在于所述反相层析纯化的柱温是 28-40℃。

如上述的方法，其特征在于所述反相层析纯化的柱温是 32-36℃。

如上述的方法，其特征在于所述反相层析纯化的柱温是 34℃。

上述的免疫原在制备治疗 HBV 慢性感染持续状态及其相关的继发性肝硬化、肝癌等疾病的疫苗或药物的用途。

10 一种如上述的用途，其特征在于所述 HBV 慢性感染持续状态为慢性乙型肝炎或乙型肝炎病毒携带者。

一种治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗含有上述的免疫原。

一种治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗含有上述的免疫原以及药学上可接受的辅料、佐剂和/或载体。

15 如上述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗是药学上可接受的任意一种剂型。

如上述治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗的制剂是注射剂、透皮剂、口服剂、吸入剂或栓剂。

20 如上述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗的剂型为乙醇溶液剂型、混悬液剂型、液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型。

如上述治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型含有磷脂。

如上述治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型还含有胆固醇。

25 如上述治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型还含有维生素 E。

如上述治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述液体脂质体剂型或冻干脂质体剂型还含有棕榈酸。

30 如上述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗中的免疫原、磷脂、胆固醇、维生素 E 和棕榈酸的摩尔比为 0.1-0.5: 40-80: 0-40: 0-10: 0-10。

如上述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗中的免疫原、

磷脂、胆固醇、维生素 E 和棕榈酸的摩尔比为 0.2-0.4: 60: 20: 6: 6。

如上述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于该疫苗中的免疫原、磷脂、胆固醇、维生素 E 和棕榈酸的摩尔比为 0.3-0.36: 60: 20: 6:

5 6。

如上述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述磷脂为大豆磷脂或卵磷脂。

一种制备上述的治疗用乙型肝炎疫苗的方法，其特征在于所述方法包括采用二次乳化法制备脂质体。

10 如上述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述冻干脂质体剂型还含有人白蛋白、甘露醇和磷酸盐。如上所述的治疗用乙型肝炎疫苗，其特征在于所述冻干脂质体剂型含上述免疫原、磷脂、胆固醇、棕榈酸、维生素 E、甘露醇、人血白蛋白、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，其摩尔比为 0.01-0.1: 5-15: 1-7: 0.5-1.5: 0.5-1.5: 70-150: 0.1-0.3: 1-10: 1-15 10。

本发明的目的也在于提供一种设计、筛选、制备本发明的如上所述免疫原或疫苗的方法。

本发明首次建立了基于表位的疫苗设计技术路线（英文译名为：EPITOPE-BASED VACCINE DESIGN, EBVD）。采用 EBVD，以乙型肝炎抗原表位图谱为基础，按照不同类型表位、不同抗原来源表位、不同的连接顺序、不同的化学修饰基团等，采用 EBVD 方案进行设计、筛选。首次确定了具有前述骨架结构的免疫原。该种分子一方面能刺激人外周血淋巴细胞产生增殖反应、Th1 极化反应、HBV 特异性 CTL 反应、抑制 HBV 的复制；比采用单表位多肽提高 200 倍以上效率。另一方面，在 HBV 转基因小鼠体内有效激发 Th1 极化反应、HBV 特异性 CTL 反应、抑制 HBV 的复制。实验结果表明上述免疫原可开发成为一种新型乙型肝炎及其继发性肝硬化、肝癌的治疗用疫苗或药物。

采用固相化学合成方法制备该种分子。确定了反应体系的最佳温度、投料比、肽树脂裂解方法和时间、纯化条件等因素。在本发明方法中，最佳反应温度 30-40℃；采用 HOBt/DCC 偶联策略， $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  四各组分连续合成，R、N、 $\alpha$  采用双偶联，原料和树脂的最佳摩尔投料比是 4: 1，每个氨基酸或组分平均偶联效率达 99.5% 以上；肽树

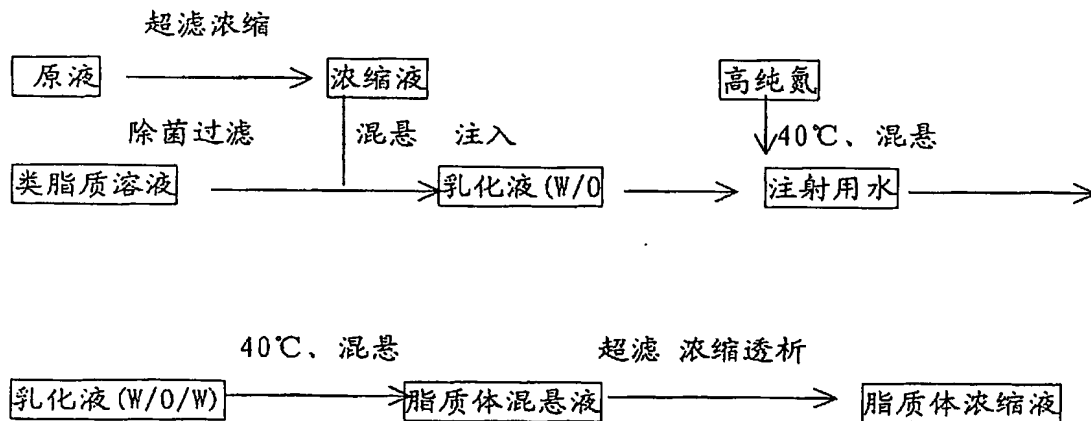
脂裂解采用三氟乙酸法，最佳裂解时间 90 分钟。

在本发明的方法中，纯化采用两步法：（1）采用体积排阻层析法初步纯化，二甲基亚砷（DMSO）为流动相，最佳柱温 20-40℃。（2）采用反相层析法高度纯化。研究了其最佳上样条件、最佳层析填料、最佳柱温度等因素。在本发明中，最佳层析填料是 POROS 50 R1，最佳柱温度 22-34℃。

经乙醇溶液、脂质体混悬液剂型、冻干剂型的比较，证明脂质体剂型在诱导 Th1 极化、诱导 CTL 活性方面优于乙醇溶液剂型、皮下注射疼痛感明显减轻。脂质体冻干剂型在稳定性方面明显优于脂质体混悬液剂型。

本发明采用  $L_9(3^4)$  正交设计、筛选获得所述免疫原脂质体注射剂最佳处方。其中，含有上述免疫原、大豆磷脂、棕榈酸、维生素 E 和/或胆固醇。

进一步比较了各种不同条件下，对脂质体形成、包封率、粒度分布等影响。确定了脂质体的制备条件和工艺流程。



本发明的第三个目的是提供将本发明的这些免疫原制成治疗 HBV 慢性感染持续状态及其相关的继发性肝硬化、肝癌的疫苗或药物的应用。

上述免疫原及其剂型，使用任何一种公知的免疫方式，例如：皮下注射、皮内注射、腹腔注射、静脉注射等进行免疫。免疫剂量可以是 0.01nmol 至 20nmol。可以不使用另外的佐剂。用于免疫小鼠或 HLA 转基因小鼠可刺激淋巴细胞活化和增殖、Th1 极化和 CTL 应答；用于免

疫 HBV 转基因小鼠可以剂量依赖性方式激淋巴细胞活化和增殖、Th1 极化和 CTL 应答，并抑制 HBV 复制、血中 HBV DNA 拷贝数下降、HBsAg、HBeAg 滴度下降或消失。该效应为单独使用单表位多肽或多表位多肽所不能达到。在体外刺激人外周血单个核细胞可以剂量依赖性方式激淋巴细胞活化和增殖、Th1 极化和 CTL 应答，后者可杀伤 HepG2. 2. 1. 5 细胞、E6 细胞，抑制 HBV 复制、HBV DNA 拷贝数下降、HBsAg、HBeAg 滴度下降或消失。该效应比单独使用单表位多肽高 200 倍以上。

#### 附图简要说明

图 1 是基于表位的疫苗设计（英文译名为：EPITOPE-BASED VACCINE DESIGN, EBVD）示意图。首先选择靶抗原，通过高分辨率的免疫识别研究获得表位图谱。基于表位图谱，采用分子设计、分子模拟技术设计免疫原。通过化学或基因合成得到该分子，进行功能筛选和毒理、药代初步评价，通过构效关系分析，对分子进行改造、优化，而后合成、评价，进入下一循环。通过 200 个循环左右，可获得先导结构。

附图 2 是诱导淋巴细胞增殖效应图，其中取 HLA-A2<sup>+</sup>健康人新鲜外周血，Ficoll-Hypaque 法分离外周血单个核淋巴细胞，用 RPMI1640 培养基（含 10% 胎牛血清）于 96 孔细胞培养板内（10<sup>6</sup> 细胞/孔）体外培养。设受试药物组为

(CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>COKSSQYIKANSKFIGITEAAFLPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA)、Pre-S2 对照组、空白对照组，分别加 IL-2 (5IU) 和受试药物，继续培养 6 天，再用相同剂量的 IL-2 和受试药物再次刺激 48 小时，并加 <sup>3</sup>H-TdR (1 μCi/ml)，继续培养 18h 后收集细胞，测 γ-记数值。结果表明受试药物可显著诱导淋巴细胞的增殖反应。最低有效剂量为 0.1ng，在 0.1-10ng 剂量范围内呈剂量依赖性反应。

附图 3 是诱导 Th1 极化的效应图，其中取 HLA-A2<sup>+</sup>健康人新鲜外周血，Ficoll-Hypaque 法分离外周血单个核淋巴细胞，用 RPMI1640 培养基（含 10% 胎牛血清、100U/ml 青链霉素）分组培养（10<sup>6</sup>/孔，24 孔细胞培养板），分别加 IL-2 (30IU) 和受试药物（不同剂量

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>COKSSPADRE

GGGWLSLLVPFVSSSDPRVRGLYFPA), 继续培养 6 天, 再用相同剂量的 IL-2 和受试药物每周刺激 1 次, 共 3 次, 末次刺激 24 小时后, 取培养上清, 用 ELISA 方法检测其中的 IL-4 和 IFN- $\gamma$  分泌情况。结果表明: 受试药物可诱导 IFN- $\gamma$  分泌, 剂量-效应显著; 而诱导 IL-4 分泌的效应不明显。提示受试药物诱导 Th1 型 T 细胞极化的功能较强, 而诱导 Th2 型 T 细胞极化的功能较弱。

附图 4 是诱导细胞毒效应图, 其中取 HLA-A2<sup>+</sup>健康人新鲜外周血, Ficoll-Hypaque 法分离外周血单个核淋巴细胞, 用 RPMI1640 培养基(含 10%胎牛血清)分组培养( $10^6$ /孔, 24 孔细胞培养板), 分别加 IL-2 (30IU) 和受试药物 (10ng

$CO, CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7CO$  XSSQYIKANSKFIGITEGGGDPRVRGLYFPA), 继续培养 6 天, 再用相同剂量的 IL-2 和受试药物每周刺激 1 次, 共 3 次, 末次刺激 3 天后, 获得抗原特异性效应 CTL 细胞。采用标准  $^{51}Cr$  释放试验检测比较细胞毒活性。靶细胞分别为: 2215 (HBV 感染的人肝细胞癌细胞系, 可模拟 HBV 感染肝细胞的功能)、E6 (人 HLA-A\*0201 转染 P815 细胞, CTL 表位肽抗原预孵)、T2 (HLA-A2<sup>+</sup>人 T、B 淋巴瘤细胞系, CTL 表位肽抗原预孵); 效靶细胞比例分别为 (E/T): 12.5、25、50、100。结果表明受试药物可诱导人 PBMC 产生 CTL 效应, 特异性溶破靶细胞(A)。上述 HLA-A2<sup>+</sup>人 PBMC 末次刺激 24 小时后, 用 ELISPOT 方法检测比较受试药物诱导 IFN- $\gamma$  分泌型 CTL 细胞在外周血淋巴细胞中的增殖效应。结果表明受试药物可诱导人 PBMC 中 IFN- $\gamma$  分泌细胞的增殖, 并有显著的剂量-效应关系 (B、C)。

附图 5 是抗病毒效应图, 其中取 HLA-A2<sup>+</sup>HBV 携带者、急性肝炎患者、慢性肝炎患者新鲜外周血单个核淋巴细胞, 做病毒抑制实验, 取上清, 测定 HBV-DNA 拷贝数 (A)、HBeAg、HBsAg 分泌量 (B、C)。结果表明随着共培养时间的增长, HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 的表达/复制被抑制, 有明显的剂量-效应关系。表明受试药物

( $CH_3(CH_2)_7CO$  XSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGCTKPTDGNCT) 诱导 HLA-A2<sup>+</sup>人 PBMC 活化有显著的剂量-效应关系。

附图 6 是剂量-效应关系图:

HBV-DNA 转基因小鼠 (ayw 型 HBV 全基因 (1.3Kb) 转染昆明种小鼠) 为模型。将动物随机分组, 每组 5 只, 于双侧腋下和后足掌皮下注射, 按 10、100、1000U/鼠的 3 个剂量给药, 每周加强免疫一次, 共 3 次。

- 5 设 IFN- $\alpha$ 2b (15000U/鼠) 为阳性对照药、设生理盐水为阴性对照药。给药结束后 30 天, 取小鼠脾脏, 分离脾脏淋巴细胞, 用试品 10ng/ml 体外刺激 3 天, 取上清, 用 ELISA 法检测培养上清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 等细胞因子的分泌情况, 分析受试药物

( $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAASIVSPFIPLLGGDPRVRGLYFPA$ )

- 10 体内诱导 T 细胞 Th1/Th2 型极化的功能。结果可检测到较强的 IFN- $\gamma$  分泌; IL-4 的检测未见明显的剂量-效应关系 (A、B、C)。上述上清液, 用 ELI-SPOT 法检测 IFN- $\gamma$  分泌细胞在外周血淋巴细胞中的表达频率。结果表明, 在结束免疫后第 30 天, 随着原免疫剂量的升高, 外周血淋巴细胞中 IFN- $\gamma$  分泌细胞的表达频率升高, 其中 100、1000U/鼠的免疫剂量, 体内诱导外周血淋巴细胞中 IFN- $\gamma$  分泌细胞的表达频率升高
- 15 明显, 最高可检测到 3660IFN- $\gamma$  分泌细胞/ $10^6$ PBMC。IFN- $\alpha$ 2b 给药组最高可检测到 1250IFN- $\gamma$  分泌细胞/ $10^6$ PBMC (D)。于三次免疫结束后的第 10、20、30 天, 取血分离血清, 分别用 ELISA 法、定量 PCR 法检测血清中 HBsAg、HBV-DNA 的含量。结果表明该品可以剂量依赖性的方式导致表面抗原分泌 (C) 水平、HBV-DNA 复制 (F) 水平的明显下降。
- 20

下面通过实施例进一步说明本发明。应该理解的是, 本发明实施例的制备方法仅仅是用于说明本发明, 而不是对本发明的限制, 在本发明的构思前提下对本发明制备方法的简单改进都属于本发明要求保护的

25 范围。

实施例 1. 采用 EBVD 对三表位治疗用 (合成肽) 乙型肝炎疫苗表位数目及其排列组合的设计和筛选

- 以乙型肝炎抗原表位图谱为基础, 按照不同类型表位、不同抗原来源表位、不同的连接顺序、不同的化学修饰基团等, 采用 EBVD 方案
- 30 进行设计、筛选表位组分的来源范围包括: HBV 之 s 抗原、e 抗原、c 抗原来源的优势 B 细胞表位、T 辅助细胞 (Th) 表位、细胞毒性 T 细胞 (CTL) 表位、其它抗原来源的通用 Th 细胞表位、表位修饰基团。在

25

表位修饰基团中考虑了有文献证明可促进免疫活性的单链脂肪酸和本发明人证明的糖类基团。采用了线形单表位修饰类、单表位分枝类（2、4、8分枝）、CTL表位-Th细胞表位嵌合体类、CTL表位-Th细胞表位嵌合体修饰类、B细胞表位-CTL表位-Th细胞表位嵌合体类、B细胞表位-CTL表位-Th细胞表位嵌合体修饰类等6类。表位间的联结顺序采用已证明对抗原性（免疫原性）无影响的-A-A-A-或-G-G-G-。由此获得200余种结构。在02工作站采用分子模拟方法（InsightII软件）比较所设计抗原多肽的结构与天然抗原的相似形、与MHC结合的位阻情况等，并对抗原多肽进行免疫原性、理化、生化特性分析，进行排序。

采用化学合成法合成所设计的免疫原。首先合成计算机排序和理论上可能性最大的结构，而后进入体外功能筛选。体外功能筛选包括：对人外周血单个核细胞诱导Th1极化、诱导HBV特异性CTL、多肽抗原特异性CTL对HepG2.2.1.5细胞HBsAg、HBeAg的抑制作用等。根据体外功能实验，对所设计的结构进行优化、改进、合成，进入下一轮实验。对体外实验所筛选到的结构，进入体内实验筛选，包括：在Balb/C小鼠诱导Th1极化、在HBV转基因小鼠抑制病毒复制、小鼠急性毒性实验等。经过大量初步筛选和比较分析发现：有3个表位是较好的候选组分。进一步的筛选表明：3表位的多肽抗原较单表位或双表位多肽抗原为优，而与四个以上表位的效果无明显差别（见表3）；三表位分子中表位间不同的排列组合以εPA44的组合效果最好（见表4）；经体内实验和体外实验证明：化学修饰中以棕榈酸共价修饰的效果较好；经单克隆抗体和肽探针技术检测证明：联结顺序的选择保证了表位在免疫原中的表位成分的免疫特异性未发生改变。筛选结果见表1和表2。

\*所列表位数目为由三类表位组成的免疫原（含不同的排列方式）。其中，C：CTL表位；B：B细胞表位；T：Th细胞表位。数字表示该表位的个数。表内所示为体外实验筛选结果。

表1 治疗用（合成肽）乙型肝炎疫苗表位数目的筛选\*

表位数目	分子模拟	Th1极化	淋巴细胞增殖	CTL应答	病毒抑制效应
------	------	-------	--------	-------	--------

26

	1C	+++	±	+	++	++
	1C-1T	+++	++	+++	+++	+++
	1C-1B	++	+	+	++	+
	1B-1T	-	+	++	-	-
5	1C-1B-1T	+++	++	++++	++++	+++
	2C-1B-1T	±	++	++++	+++	+++
	2T-1B-1C	±	++	+++	+++	+++

10 表 2 三表位分子中不同排列组合的筛选\*

	排列方式	分子模拟	Th1 极化	淋巴细胞增殖	CTL 应答	病毒抑制效应
	T-C-B	+++	++	++++	++++	+++
15	T-B-C	++	++	+++	++	++
	C-T-B	++	+	++	+	±
	C-B-T	+	++	+++	++	+
	B-T- C	+++	++	++++	+++	++
	B-C-T	+++	+	++	++	+

20 \*排列方式指从 N-末端向 C-末端的表位排布。其中, C: CTL 表位; B: B 细胞表位; T: Th 细胞表位。表内所示为体外实验筛选结果

25 实施例 2.  $CH_3(CH_2)_{10}CO$  KSSPADREGGSLNFLGGTTVSSSDPRVRGLYFPA 的固相化学合成

30 采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料, 上样量 1mM, 侧链保护为: Ser (tBu), Thr (tBu), Tyr (tBu)、His (Trt)、Gln (Trt)、ASP (OtBu)、Glu (OtBu)、Arg (Pmc)。选用 HMP-树脂为固相载体, 上样量 0.25mM, 原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化, 其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中, 天冬酰胺、精氨酸和棕榈酸采



用双偶联，棕榈酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 80% 左右。

5

实施例 3.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAALLCLIFLLVGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。  
10 在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为: Ser (tBu), Thr (tBu), Tyr (tBu)、His (Trt)、Gln (Trt)、ASP (OtBu)、Glu (OtBu)、Arg (Pmc)。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈  
15 酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，天冬酰胺、精氨酸和棕榈酸采用双偶联，棕榈酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 85% 左右。

20

实施例 4.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAALLDYQGMLPVGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。  
在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，  
25 上样量 1mM，侧链保护为: Ser (tBu), Thr (tBu), Tyr (tBu)、His (Trt)、Gln (Trt)、ASP (OtBu)、Glu (OtBu)、Arg (Pmc)。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，天冬酰胺、精氨酸和棕榈酸  
30 采用双偶联，棕榈酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋

转转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 80% 左右。

实施例 5.  $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)-$   
 $CO, CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7CO$  XSSQYIKANSKFIGITEGGGDPRVRGLYFPA

5 的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为：Ser (tBu)，Thr (tBu)，Tyr (tBu)、His (Trt)、Gln (Trt)、ASP (OtBu)、Glu (OtBu)、Arg (Pmc)。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

15 切割与脱保护：用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、转转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 80% 左右。

实施例 6.

$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2)_7CO$  FLPSDFFPSVAAADPRVRGLYFPA 的  
20 固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

25 切割与脱保护：用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、转转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 80% 左右。

实施例 7.  $CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COKSSPADRE$   
GGGWLSELLVPFVSSSDPRVRGLYFPARGLYFPA 的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 80%左右。

实施例 8.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 80%左右。

实施例 9.  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽

羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化,其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中,采用双偶联,脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

5 切割与脱保护:用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下,乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物,经 HPLC 鉴定,此粗肽产物纯度稳定在 80%左右。

实施例 10.  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREGGGLVPFVQWFVSSSDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

10 采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料,上样量 1mM,侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体,上样量 0.25mM,原料/树脂比 4:1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化,其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中,采用双偶联,脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

15 切割与脱保护:用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下,乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物,经 HPLC 鉴定,此粗肽产物纯度稳定在 75%左右。

20

实施例 11.  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREAAAGLSPTVWLSVGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

25 采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料,上样量 1mM,侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体,上样量 0.25mM,原料/树脂比 4:1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化,其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中,采用双偶联,脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

30 切割与脱保护:用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下,乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物,经 HPLC 鉴定,此粗肽产物纯度稳定在 78%左右。

34

实施例 12.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAALLPIFFCLWVGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 80%左右。

实施例 13.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAYVNTNMGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 83%左右。

实施例 14.

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样

32

量 0.25mM, 原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化, 其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中, 采用双偶联, 脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

- 5 切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下, 乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物, 经 HPLC 鉴定, 此粗肽产物纯度稳定在 80%左右。

实施例 15.

- 10  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEGGGFLPSDFFPSVSSSDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料, 上样量 1mM, 侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体, 上样  
15 量 0.25mM, 原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化, 其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中, 采用双偶联, 脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

- 20 切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下, 乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物, 经 HPLC 鉴定, 此粗肽产物纯度稳定在 80%左右。

实施例 16.

- 25  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAYVNTNMGLKGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

- 采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料, 上样量 1mM, 侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体, 上样  
30 量 0.25mM, 原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化, 其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中, 采用双偶联, 脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

33

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下, 乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物, 经 HPLC 鉴定, 此粗肽产物纯度稳定在 81% 左右。

5 实施例 17.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAPLGFFPDHGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料, 上样量 1mM, 侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体, 上样量 0.25mM, 原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化, 其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中, 采用双偶联, 脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

15 切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下, 乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物, 经 HPLC 鉴定, 此粗肽产物纯度稳定在 81% 左右。

实施例 18.

20  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSYIKANSKFIGITEAAA MQWNSTALHQALQDP GGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料, 上样量 1mM, 侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体, 上样量 0.25mM, 原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化, 其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中, 采用双偶联, 脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

25 切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下, 乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物, 经 HPLC 鉴定, 此粗肽产物纯度稳定在 86% 左右。

实施例 19.  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPDAREAAASILSKTGDPVGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 78%左右。

实施例 20.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAAVLQAGFFLLGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 83%左右。

实施例 21.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADRESSSFLLTRILTIGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第



一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化,其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中,采用双偶联,脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

5 切割与脱保护:用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下,乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物,经 HPLC 鉴定,此粗肽产物纯度稳定在 80%左右。

实施例 22.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAFLGGTPVCLGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

10 采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料,上样量 1mM,侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体,上样量 0.25mM,原料/树脂比 4:1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化,其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中,采用双偶联,脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护:用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下,乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物,经 HPLC 鉴定,此粗肽产物纯度稳定在 74%左右。

20

实施例 23.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAGLSPTVWLSVGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

25 采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料,上样量 1mM,侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体,上样量 0.25mM,原料/树脂比 4:1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化,其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中,采用双偶联,脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

30 切割与脱保护:用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下,乙醚沉淀、旋

转转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 78% 左右。

#### 实施例 24.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAASIVSPFIPLLGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、转转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 79% 左右。

实施例 25.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAASTLPETTVVRRGGGDPRVRGLYFPA$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、转转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 82% 左右。

#### 实施例 26.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGCTKPTDGNCT$  的固相化学合成

采用 Fmoc 固相化学合成方案。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。在 Applied Biosystems 431A 多肽合成仪上进行。Fmoc 氨基酸为原料，上样量 1mM，侧链保护为同实施例 3。选用 HMP-树脂为固相载体，上样量 0.25mM，原料/树脂比 4: 1。偶联到树脂上的氨基酸(多肽羧基端第一个氨基酸)采用对称酸酐活化法活化，其余氨基酸和棕榈酸的活化采用 HOBt/DCC 活化法。其中，采用双偶联，脂肪酸偶联后无脱 Fmoc 保护基团步骤。

切割与脱保护: 用 TFA、EDT、苯甲硫醚、结晶苯酚和超纯水按一定比例混合液将肽从树脂上、侧保护性基团从氨基酸上切下，乙醚沉淀、旋转蒸发得粗肽产物，经 HPLC 鉴定，此粗肽产物纯度稳定在 85%左右。

实施例 27.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSVGGGCTKPTDGNCT$  肽树脂的裂解

选用 TFA 裂解液 (0.75 g 苯酚、0.25 ml 乙二硫醇、0.5 ml 苯甲硫醚、0.5 ml 去离子水、10.0 ml TFA)，可最大限度地抑制副反应的发生。首先，比较  $\epsilon$  P A 4 4 肽树脂裂解反应浓度，对其裂解液分离纯化的影响。反应条件，裂解液体积: 1.5 ml; 反应温度: 25℃; 反应时间: 2.0 小时。反应结束后滤除树脂，收集的滤液在 20℃水浴下，缓慢加入 1.0 ml 二甲基亚砷(DMSO)并及时摇动散热。采用体积排阻层析(SEC)，加上样品 2.0 ml 进行  $\epsilon$  P A 4 4 的分离纯化。层析条件，层析系统: P-6000 泵及 AKTAexplorer 100; 层析柱: 直径 10 mm，柱长 250 mm，填料 Sephadex LH20; 流动相: DMSO; 流速: 0.4 ml/min。收集  $\epsilon$  P A 4 4 组分并进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析，测定纯度和含量并计算“肽/肽树脂(□)”。

表 3 肽树脂裂解反应浓度对其裂解液分离纯化的影响

肽树脂浓度 (mg/ml)	加入 DMSO	肽/肽树脂 (%) *
26.67	无沉淀	28.17
40.00	无沉淀	29.80
53.33	有沉淀	26.03

\* 注: 以“肽/肽树脂(%)”间接反映出“收率”的变化。

表 3 的结果显示, 当  $\epsilon$  P A 4 4 肽树脂浓度过高 (53.33 mg/ml) 时, 裂解液加入 DMSO 可产生沉淀, 分离的  $\epsilon$  P A 4 4 占肽树脂 26.03%, 收率较低; 当  $\epsilon$  P A 4 4 肽树脂浓度为 40 mg/ml 时, 裂解液加入 DMSO 不产生沉淀, 分离的  $\epsilon$  P A 4 4 占肽树脂 29.80%, 收率较高。因此, 将  $\epsilon$  P A 4 4 肽树脂裂解反应浓度确定为 40 mg/ml。

采用上述方法及确定的  $\epsilon$  P A 4 4 肽树脂裂解反应浓度下, 进一步观察裂解反应时间对肽树脂裂解液分离纯化的影响。

表 4 裂解反应时间对肽树脂裂解液分离纯化的影响

裂解时间 (h)	$\epsilon$ P A 4 4 纯度 (%)	肽/肽树脂 (%) *
0.5	55.44	19.90
1.0	64.74	29.72
1.5	66.16	29.89
2.0	64.92	29.80
2.5	61.80	22.75
3.0	60.78	20.86

\* 注: 以 “肽/肽树脂 (%)” 间接反映出 “收率” 的变化。

由表 4 可以看出, 将裂解反应时间控制在 1~2 小时, 肽树脂裂解液经 SEC 分离后, 收集的  $\epsilon$  P A 4 4 纯度和收率均较高。因此将裂解反应时间确定为 1.5 小时。

实施例 28.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAASTLPETT V V R R G G D P R V R G L Y F P A$  肽树脂裂解液的初步纯化

在 DMSO 中  $\epsilon$  P A 4 4 溶解性好且稳定, 而在其它溶液中溶解度及稳定性均不够理想, 详见表 5。因此选用 DMSO 作为 SEC 的流动相。

表 5 在不同溶液体系中的溶解度和稳定性

溶液体系	溶解度 (mg/ml)	稳定性
0.1mol/L PB (pH6.8)	0.01	—
2 □ 吐温 80 — 0.1mol/L PB (pH6.8)	0.08	—

79

50□ 乙腈 — 0.1□ TFA	1.67	不稳定
50□ 甲醇 — 0.1□ TFA	1.54	—
50□ 乙醇 — 10mmol/L HCl	2.48	不稳定
50□ 乙醇 — 10mmol/L 磷酸	2.43	不稳定
DMSO	11.7	稳定*
50□ DMSO	2.53	—

\* 注：室温下放置 1 个月，经 RP-HPLC 分析 ε P A 4 4 纯度和含量无变化。

在上述确定的裂解反应条件下进行批量制备。采用 SEC 加样 55.0 ml，进行 ε P A 4 4 肽树脂裂解液的初步纯化。层析条件，层析系统：P-6000 泵及 AKTAexplorer 100；层析柱：直径 25 mm，柱长 850 mm，填料 Sephadex LH20；流动相：DMSO；流速：2.0 ml/min。收集 ε P A 4 4 组分并进行 RP-HPLC 分析，测定纯度和含量并计算“肽/肽树脂(□)”。

10

表 6 肽树脂裂解液的初步纯化效果及重复性观察

批号	纯度(%)	肽/肽树脂(%)*
1	52.96	47.27
2	50.58	47.21
3	55.76	46.31
$\bar{x} \pm Sx$	$53.10 \pm 2.59$	$46.93 \pm 0.54$

\* 注：以“肽/肽树脂(%)”间接反映出“收率”的变化。

结果见表 6 及层析图谱。采用 DMSO 作为流动相以及上述 SEC 对树脂裂解液进行初步纯化，收集的 ε P A 4 4，纯度为  $53.10 \pm 2.59\%$ ，占肽树脂的  $46.93 \pm 0.54\%$ 。得到了较好的初步纯化效果及重复性。

### 实施例 29.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAGLSPTVWLSVGGGDPRVRGLYFPA$  精制

### 20 方法

采用层析技术作为 ε P A 4 4 的精制方法。比较凝胶过滤、离子

40

交换层析和反相层析对  $\epsilon$  P A 4 4 的纯化效果, 收集  $\epsilon$  P A 4 4 洗脱峰峰尖并进行 RP-HPLC 分析纯度。

5 凝胶过滤层析不能达到精制的要求; 离子交换层析未见到明显的洗脱峰, 非特异性吸附严重, 不宜采用; 而反相层析尽管成本较高, 却能够满足精制的要求。

表 7 不同层析方法纯化的纯度比较

精制方法	纯度 (%)
凝胶过滤	78.12
离子交换层析	—
反相层析	99.18

#### 实施例 30. 反相层析填料的筛选

10 采用不同的反相层析填料装柱, 分别对  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAFLGGTPVCLGGGDPRVRGLYFPA$  进行精制, 收集洗脱峰峰尖并进行 RP-HPLC 分析纯度。

表 8 不同反相层析填料固定相的纯化比较

反相层析填料	纯度 (%)
Dleta Pak C18	97.69
SOURCE 30 RPC	94.26
POROS 50 R2	96.24
POROS 50 R1	98.73

15 结果见表 8。选择疏水性较弱的反相层析填料 POROS 50 R1 作为固定相, 收集的洗脱峰峰尖纯度较高。表明采用反相层析对疏水性较强的本品进行纯化时, 不宜选用疏水性较强的反相层析填料 (Dleta Pak C18、SOURCE 30 RPC 和 POROS 50 R2) 作为固定相。

#### 20 实施例 31. 离子对试剂对

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADRESSSFLLTRILTIGGGDPRVRGLYFPA$  反相层析的影响  
采用层析柱 SR 10/450 POROS 50 R1 进行反相层析, 比较了采用

CP1

00.00.10

不同的流动相进行纯化对纯度的影响。层析条件，层析系统：AKTAexplorer 100；样品及加样量：2.0 ml；层析柱：直径 10 mm，柱长 450 mm，填料 POROS 50 R1；柱温：25℃；流动相 (A、B)：详见表 6-07；梯度：0~100□B，10 CV(柱体积)；流速：4.0 ml/min。收集 ε P A 4 4 洗脱峰峰尖并进行 RP-HPLC 分析纯度。

表 9 离子对试剂对反相层析中纯度的影响

流动相		纯度 (%)
A	B	
30□ 乙醇	90□ 乙醇	—
30□ 乙醇-10 mmol/L NaOH	90□ 乙醇-10 mmol/L NaOH	81.73
30□ 乙醇-20 mmol/L HCl	90□ 乙醇-20 mmol/L HCl	98.73

由表 9 可以看出，以乙醇溶液作为流动相，当不加入任何离子对试剂时，未见明显的本品洗脱峰；当加入离子对试剂时，可以使本品被完全洗脱下来。其中，加入酸(HCl)比碱(NaOH)更有利于 ε 本品纯化。

### 实施例 32. 反相层析柱温的确定

选用磷酸代替盐酸作为离子对试剂(可避免将来对大规模不锈钢层析制备系统的腐蚀作用)，并采用层析柱 SR 10/200 POROS 50 R1，进一步观察柱温对 CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>COKSSPADREAAVLQAGFFLLGGGDPRVRGLYFPA 在反相层析中纯度和收率的影响。层析条件，层析系统：AKTAexplorer 100；样品及加样量：ε P A 4 4 (10.34 mg/ml)，0.5 ml；层析柱：直径 10 mm，柱长 200 mm，填料 POROS 50 R1；柱温：详见表 6-08；流动相 A：30□乙醇-10 mmol/L 磷酸，流动相 B：90□乙醇-10 mmol/L 磷酸；梯度：0~50 □B，5 CV、50~100□B，0.5 CV、100~100□B，0.5 CV；流速：4.0 ml/min。收集洗脱峰并进行 RP-HPLC 分析，测定纯度和含量并计算收率。

表 10 柱温对反相层析中纯度和收率的影响

72

柱温 (°C)	纯度 (%)	收率 (%)
22	95.79	6.33
28	96.74	40.69
32	97.53	46.51
36	97.71	45.98
40	97.61	35.32

表 10 中的结果显示, 当柱温为 22℃时, 由于样品中的本品溶解于 DMSO, 此温度下样品溶液的粘度较大, 不利于本品的扩散以及同固定相结合, 使其大部分随溶剂峰穿过柱子, 造成了纯化后的本品收率降低; 当柱温升高到 28~40℃时, 收率较室温(22℃)有显著的提高。其中, 确定的优化后反相层析柱温为 32~36℃。

实施例 33.  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPDAREAAASILSKTGDPVGGDPRVRGLYFPA$  反相层析加样量及载量的确定

由于本品溶解在 DMSO 中, 加样量和样品中本品浓度, 都可能成为影响层析过程的重要参数。因此进一步观察了加样量及载量, 对本品在反相层析中纯度和收率的影响。层析条件, 层析系统: AKTAexplorer 100; 样品及加样量: 本品 (10.34 mg/ml), 见表 6-09; 层析柱: 直径 10 mm, 柱长 450 mm, 填料 POROS 50 R1; 柱温: 34℃; 流动相 A: 30% 乙醇-10 mmol/L 磷酸, 流动相 B: 90% 乙醇-10 mmol/L 磷酸; 梯度: 0~50%B, 5 CV、50~100%B, 0.5 CV、100~100%B, 0.5 CV; 流速: 4.0 ml/min。收集本品洗脱峰并进行 RP-HPLC 分析, 测定纯度和含量并计算收率。

表 11 样品量对本品在反相层析中纯度和收率的影响

加样量 (ml)	加样量/柱体积 (%)	载量 (mg/ml)	纯度 (%)	收率 (%)
0.50	1.41	0.14	99.37	68.96
0.75	2.12	0.22	99.08	68.24
1.00	2.83	0.29	97.88	65.66



43

由表 11 看出, 当加样量低于 0.75 ml 时, 纯化后本品纯度达到 99 □ 以上, 收率接近 70 □; 当加样量为 1.00 ml 时, 收率降低且纯度仅为 97.88 □, 达不到精制的要求。因此, 通常加样量和载量控制在柱体积的 2 □ 和 0.2 mg/ml 左右。

5

### 实施例 34.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSYIKANSKFIGITEAAAMQWNSTALHQALQDPGGGDPRVRGLYFPA$   
原液的批量精制效果及重复性观察

10 采用层析柱 AP5 50/275 POROS 50 R1 进行批量制备。肽树脂经过裂解和初步纯化后, 收集的  $\epsilon$  P A 4 4 样品分成 7 次进行高度纯化, 进一步观察了  $\epsilon$  P A 4 4 原液的批量精制效果及重复性。层析条件, 层析系统: AKTAexplorer 100; 样品: 详见表 6-10, 加样量: 11.0 ml; 层析柱: 直径 50 mm, 柱长 275 mm, 填料 POROS 50 R1; 柱温: 34℃; 流动相 A: 30 □ 乙醇-10 mmol/L 磷酸, 流动相 B: 90 □ 乙醇-10 mmol/L  
15 磷酸; 梯度: 0 ~ 50 □ B, 5 CV、50 ~ 100 □ B, 0.5 CV、100 ~ 100 □ B, 0.5 CV; 流速: 100.0 ml/min。将收集的  $\epsilon$  P A 4 4 洗脱峰合并液混匀后, 取样经检定合格即为原液, 存放于 -20℃ 备用。并且根据检定结果计算出本品的产量、收率和比活性。

20 结果见表 12。经过反相层析高度纯化批量精制的原液, 本品的产量为  $694.88 \pm 12.71$  mg, 纯度为  $98.66 \pm 0.14$  □, 收率为  $86.89 \pm 0.43$  □, 比活性为  $11689.76 \pm 1503.57$  U/mg。达到了较好的精制效果及重复性。

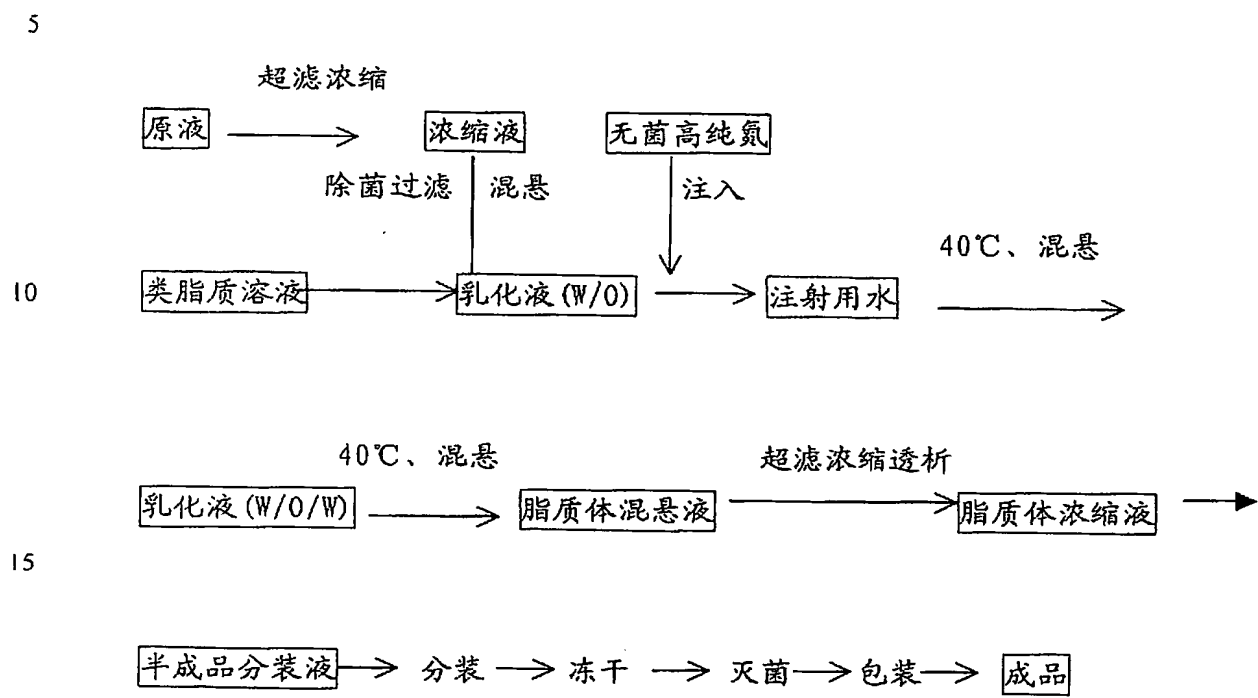
表 12. 本品原液的批量精制效果及重复性观察

批号	样 品		次 数	$\epsilon$ P A 4 4			
	纯度 (%)	浓度 (mg/ml)		产量 (mg)	纯度 (%)	收率 (%)	比活 (U/mg)
1	52.96	10.52	7	707.00	98.54	87.28	13261.42
2	50.58	10.44	7	695.97	98.63	86.58	11542.77
3	55.76	10.21	7	681.66	98.81	86.71	10265.08

				694.88	98.66	86.89	11689.76
x	53.10	10.39	—				
±	± 2.59	± 0.16		± 12.71	± 0.14	± 0.43	± 1503.57
Sx							

实施例 35.

冻干  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAA$  PLGFFPDH GGGDPRVRGLYFPA 脂质体注射剂工艺流程



实施例 38. 冻干

20  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAA$  YVNTNMGLK GGGDPRVRGLYFPA 脂质体注射剂制备工艺

25 工艺过程中通入无菌高纯氮气，以防磷脂氧化并促使乙醚挥发。采用超滤方法反复对脂质体混悬液进行浓缩和透析，最终的体积浓缩倍数和透析倍数分别达到 8 倍和 200 倍以上，以除去液体中残留的有机溶剂。工艺过程中各物料及其体积变化详见表 16-1。

表 13 工艺过程中的物料名称及其体积比

物料名称	体积比
本品浓缩液	1

45

类脂质(乙醚)溶液	1
乳化液(W/O)	2
注射用水	50
脂质体浓缩液	2~6
半成品分装液	4~8

### 实施例 39 一种乙型肝炎治疗用疫苗处方

选用最常用的大豆磷脂和胆固醇构成磷脂双分子层膜。其中，前者是主要的类脂质成分，后者兼有稳定磷脂双分子层膜的作用。另外添加少量棕榈酸和维生素E，前者能够增加负电荷数量，增强脂质体对  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGDPRVRGLYFPA$  (pI 8.1) 的结合能力；后者是为了防止磷脂氧化分解。甘露醇和人血白蛋白可作为冻干脂质体的保护剂和赋形剂。磷酸缓冲液(pH 6.5)可减缓大豆磷脂的水解，并调节渗透压至等渗。

### 实施例 40.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEGGGFLPSDFFPVSSSDPRVRGLYFPA$  治疗性疫苗制剂类脂质成分及脂质体形成条件的确定

采用二次乳化法制备脂质体，将类脂质成分溶解于乙醚溶液中，再与本品浓缩液混合，形成乳化液(W/O)，注入磷酸缓冲液(PB)或水中，同时控制温度和搅拌，二次形成乳化液(W/O/W)，随着乙醚的挥发逐步形成脂质体。通过超滤装置浓缩和透析(透析倍数须达到 200 倍以上)以及  $10\mu m$  微孔滤膜过滤，以除去液体中可能游离的和可能发生聚集沉淀的本品。取样进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析，测定包封量并与投药量比较计算脂质体包封率。试验设计采用  $L_9(3^4)$  正交表。

表 14 乙醚溶液成分及脂质体形成条件对其包封率的影响

编号	大豆磷脂/胆固醇 A (mmol/L)	棕榈酸 B (mmol/L)	温度 C (°C)	PB 浓度 D (mmol/L)	包封率 (%)
1	40/40	0	40	0	93.16
2	40/40	2	50	15	54.75

48

3	40/40	6	60	75	44.92
4	60/20	0	50	75	69.48
5	60/20	2	60	0	97.27
6	60/20	6	40	15	79.26
7	80/0	0	60	15	53.75
8	80/0	2	40	75	79.29
9	80/0	6	50	0	109.4
I	192.83	216.39	251.71	299.83	D I 影
II	246.01	231.31	233.63	187.76	C I 响
III ↓	242.44	233.58	195.94	193.69	A II 递
R	53.18	17.19	55.77	112.07	B III 减
P□	0.10	—	0.10	0.05	

注：1~9 编号乙醚溶液中均含 6 mmol/L 维生素 E。

表 14 中结果表明，影响的主要因素依次为 D、C、A 和 B，因素与水平的最佳组合为 A II B III C I D I。

5

实施例 41. 免疫原浓度对脂质体包封率的影响

在上述正交试验确定的配方和条件基础上，比较了免疫原溶液的浓度对脂质体包封率的影响。

结果见表，当免疫原浓度在 1.0~2.0 mg/ml 之间时，脂质体包封率均在 90 %以上 ( $P > 0.05$ )；当浓度增加至 2.5 mg/ml 时，包封率降至 80 %以下 ( $P < 0.001$ )。因此在制备脂质体时，将免疫原原液超滤浓缩至 1.5~2.0 mg/ml。

表 15 不同浓度  $\epsilon$  P A 4 4 溶液对脂质体包封率的影响

$\epsilon$ P A 4 4 浓度 (mg/ml)	脂 质 体 包 封 率 (%)			
	1	2	3	$\bar{X} \pm S_x$
1.0	92.12	92.80	93.62	$92.85 \pm 0.75$
1.5	94.38	92.67	93.96	$93.67 \pm 0.89$
2.0	92.94	91.93	90.70	$91.86 \pm 1.12$
2.5	79.94	79.30	75.23	$78.16 \pm 2.55$

实施例 41.

$CH_3(CH_2)_{16}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGDPRVRGLYFPA$  一种冻干  $\varepsilon$  P A 4 4 脂质体注射剂处方的确定

- 5 在表 16 中, 编号 1~11 配方均含 5 %甘露醇/10 mmol/L 磷酸缓冲液( $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$  为 60/40)。

表 16 脂质体浓缩液和赋形剂及其浓度对冻干的影响

编号	脂质体浓缩液* (%, V/V)	赋形剂及其浓度 (%, W/V)	脂质体冻干后 外形收缩程度
1	50	—	++++
2	25	—	+++
3	50	聚维酮 K30 (1.0)	+++
4	25	聚维酮 K30 (1.0)	++
5	50	聚维酮 K30 (0.5)	+++
6	25	聚维酮 K30 (0.5)	+++
7	50	人血白蛋白 (1.0)	—
8	25	人血白蛋白 (1.0)	—
9	50	人血白蛋白 (0.5)	+
10	25	人血白蛋白 (0.5)	+
11	—	—	—

10 \* 注: 浓缩后的脂质体浓缩液体积等于乳化液(W/O)体积(参见表 16-1)。

15 当脂质体浓缩液加量为半成品分装液的 25~50%(V/V)时, 选择加入 1%人血白蛋白为赋形剂能得到很好的冻干效果。因此, 当浓缩后的脂质体浓缩液体积等于乳化液(W/O)体积时, 将脂质体浓缩液体积确定为分装液体积的 37.5%(V/V), 即脂质体浓缩液加量的平均水平。此时, 分装液中各辅料浓度应符合表 16-4 的要求, 分装量为 1 ml 且符合冻干脂质体注射剂处方的要求。实际操作时, 经常由于脂质体浓缩液体积大于乳化液(W/O)体积, 可能使分装液体积增大, 需按以下公式计算实际分装量, 即:

48

分装液体积

× 37.5 % (ml)

乳化液 (W/O) 体积

给药时均加入 1 ml 注射用水悬浮。

实施例 42. 冻干

5  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAYVNTNMGGGDPRVRGLYFPA$  注射剂的批量制备结果及重复性观察

在上述试验确定的工艺条件下, 经本品原液的超滤浓缩及脂质体的制备, 加入辅料液分装、冻干和辐射灭菌, 进行本品冻干注射剂成品的批量制备。

10

表 17 本品冻干注射剂的批量制备结果及重复性观察

批号	脂质体包封率 (%)	脂质体粒度分布 (μm)*			ε P A 4 4 含量 (μg/瓶)	比活性 (U/mg)
		D50	D90	D99		
1	90.08	0.25	0.72	2.74	294.76	14173.51
2	88.38	0.30	0.75	2.06	309.14	13798.85
3	90.83	0.33	0.94	3.69	305.43	12910.01
$\bar{x}$	89.76	0.29	0.80	2.83	303.11	13627.46
±Sx	±1.26	±0.04	±0.12	±0.82	±7.47	±648.95

\* 注: D50、D90 和 D99 分别指 10□、50□和 90□的粒子其粒径均小于该值。

15 表 17 的结果显示, 批量制备的本品脂质体包封率为  $89.76 \pm 1.26$  □; 本品注射剂成品中, 脂质体的 D50、D90 和 D99 分别为  $0.29 \pm 0.04$ 、 $0.80 \pm 0.12$  和  $2.83 \pm 0.82$ , ε P A 4 4 含量为  $303.11 \pm 7.47 \mu g/瓶$ , 比活性为  $13627.46 \pm 648.95 U/mg$ 。达到了较好的重复性。

20 实施例 43.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAA LLPIFFCLWVGGDPRVRGLYFPA$  的淋巴细胞转化实验:

2-3 月龄 Balb/c 小鼠, 雌雄均可。分 0.001nmol, 0.01nmol, 0.1nmol、0.5nmol、1nmol、10nmol、20nmol、40nmol 共 8 个剂量组, 双侧后

足掌免疫  $\epsilon$  P A 30, 每周一次, 共 3 次。脱颈处死小鼠, 无菌条件下取双侧月国窝淋巴结, 用 3H-TdR 掺入法检测, 结果证明 0.01nmol 起效, 在 0.01nmol 至 20nmol 的剂量范围内呈剂量依赖性反应。

- 5 实施例 44.  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREAAAGLSPTVWLSVGGGDPRVRGLYFPA$  中和性抗体检测及特异性鉴定:

2-3 月龄 Balb/c 小鼠, 雌雄均可。分 0.001nmol, 0.01nmol, 0.1nmol、0.5nmol、1nmol、10nmol、20nmol、40nmol 共 8 个剂量组, 双侧后足掌免疫  $\epsilon$  P A 44, 每周一次, 共 3 次。免疫结束后 3 周, 取眼球放  
10 血, 收集血清, 用双抗体夹心法检测抗体。采用国际上全部的 10 株单抗, 通过抗体竞争抑制实验检测其特异性。证明 0.01nmol 可诱发抗体产生, 在 0.01nmol 至 20nmol 的剂量范围内呈剂量依赖性反应。此抗体为 HBV 中和性抗体。

- 15 实施例 45.  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREGGGLLVPFVQWFVSSSDPRVRGLYFPA$  诱导 Th1 极化检测

2-3 月龄 Balb/c 小鼠, 雌雄均可。0.001nmol, 0.01nmol, 0.1nmol、0.5nmol、1nmol、10nmol、20nmol、40nmol 共 8 个剂量组, 双侧后足掌免疫  $\epsilon$  P A 44, 每周一次, 共 3 次。免疫结束后 3 周, 取眼球放  
20 血, 收集血清。采用 ELISA 法检测 Th1/Th2 细胞因子。结果证明本品 0.01nmol 剂量可在体诱导 IFN- $\gamma$ 、IL-2 为优势的细胞因子产生, 且在 0.01nmol—10nmol 剂量范围内呈剂量依赖性反应。

实施例 46. ELISPOT 法检测

- 25  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSPADREAAAFPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$  诱导的细胞毒性

2-3 月龄 Balb/c 小鼠, 雌雄均可。分 0.001nmol, 0.01nmol, 0.1nmol、0.5nmol、1nmol、10nmol、20nmol、40nmol 共 8 个剂量组, 双侧后足掌免疫本品, 每周一次, 共 3 次。分别在免疫后第 6、12、18、24  
30 天, 自小鼠眼眶后无菌采取抗凝血, Ficoll-Hypaque 法分离 PBMC, 用 RPMI1640 培养基 (含 10% 小牛血清、100  $\mu$ /ml 青链霉素) 体外培养 (10<sup>6</sup>/ml, 96 孔细胞培养板) 一天, 待其恢复原生长状态后, 用作待测细

胞。ELISPOT 96 孔细胞培养板用 IFN- $\gamma$  包被抗体预包被过夜, 每孔设 3 个复孔, 用含 5% 小牛血清的 RPMI1640 室温封闭 1 小时, 空干后, 加入待测细胞 ( $5 \times 10^4$  细胞/100 $\mu$ l/孔, 含 RPMI1640 培养基、10% 小牛血清、100  $\mu$ /ml 青链霉素、1 $\mu$ g/ml 肽), 其中以 melan A27-35 肽免疫的小鼠 PBMC 为阴性对照, 培养 15 小时后, 洗涤 6 次, 空干板, 加生物素标记的检测抗体, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时, 再次洗涤, 空干后, 加底物显色, 计数斑点数目。结果表明最低有效剂量为 0.01nmol, 在 0.01nmol—20nmol 剂量范围内呈剂量依赖性反应。

#### 10 实施例 47.

$CH_3(CH_2)_{14}CCKSSQYIKANSKFIGITEAAFLPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$  诱导健康人外周血单个核细胞 (PBMC) 增殖实验

无菌取正常人的抗凝外周血, 常规 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC, 用 RPMI1640 培养基 (含 10% 小牛血清、100u/ml 青链霉素、L-谷氨酰胺), 在 24 孔细胞培养板中体外培养, 细胞浓度为  $10^6$ /ml。设空白对照组、试验组、Pre-S (2) 对照组, 分别加 IL-2 (30IU/ml) 和受试药物 (0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml), 继续培养 6 天后, 再用相同剂量的 IL-2 和受试药物同剂量下再次刺激 1 次, 并加 3H-TdR (1 $\mu$ Ci/ml), 继续培养 18h 后收集细胞, 液闪检测。结果表明: 在 0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml 剂量范围内, 本品以剂量依赖方式刺激人 PBMC 增殖。

#### 实施例 48.

$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2)CCKSSPADREGGWLSLLVPFVSSSDPRVRGLYFPA$  诱导健康人外周血单个核细胞 (PBMC) Th1/Th2 极化分析

无菌取正常人的抗凝外周血, 常规 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC, 用 RPMI1640 培养基 (含 10% 小牛血清、100u/ml 青链霉素、L-谷氨酰胺), 在 24 孔细胞培养板中体外培养, 细胞浓度为  $10^6$ /ml。设正常对照组、含受试药物组, 分别加 IL-2 (30IU/ml) 和受试药物 (0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml), 培养 6 天后, 再用相同剂量受试药物再次刺激 1 次, 3 天后, 离心取上清, 用 Endogen 试剂盒检测 Th1/Th2 极化。结果表明, Pre-S (2) 可诱导较强的 Th2 型的 T 细胞转化, 但基本不能诱



导 T 淋巴细胞向 Th1 型转化; 受试药物能够诱导 T 淋巴细胞向 Th1、Th2 型转化, 尤以 Th1 型转化明显。

#### 实施例 49.

- 5  $CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2)_7COFLPSDFFPSVAAADPRVRGLYFPA$  诱导 HBV 特异性效应 CTL 的诱导及细胞毒活性检测

人 PBMC 用 RPMI1640 培养基 (含 10% 小牛血清、100  $\mu$ /ml 青链霉素) 分组培养 (10<sup>6</sup>/ml, 24 孔细胞培养板) 一天, 待其恢复原生长状态后, 分别加 IL-2 (30IU/ml) 和受试药物 (0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml),  
10 继续培养 6 天后, 再用相同剂量的 IL-2 和受试药物每周刺激 1 次, 共 3 次, 末次刺激 3 天后, 获得抗原特异性效应 CTL 细胞。采用标准 <sup>51</sup>Cr 释放试验检测比较细胞毒活性。靶细胞 (肽预包被的 T2 细胞和 HepG2.2.1.5 细胞) 培养至状态良好, 用前 10 小时在培养液中加入受试药物 10  $\mu$ g/ml, 继续培养。10<sup>6</sup> 靶细胞置于 1 ml RPMI 1640 培养基  
15 (含 20% 小牛血清) 中, 加 100  $\mu$ Ci <sup>51</sup>Cr (NEN), 于 37℃ 水浴中标记 2 小时。标记后的靶细胞用无菌 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次 (500rpm/5min), 然后以 10<sup>4</sup> 靶细胞/50ul/孔的数量铺于 96 孔 V-型底细胞培养板中, 每孔做 3 个复孔。按效靶比 (E/T) 12.5、25、50、100: 1 分别加入效应细胞, 轻轻振荡混匀, 500rpm 离心 3-5 分钟, 然后置  
20 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中共培养 4 小时。取上清检测  $\gamma$  计数值。最大释放值为 10<sup>4</sup> 靶细胞置于 1mol/L 盐酸中培养所得上清的  $\gamma$  计数值, 最小释放值为 10<sup>4</sup> 靶细胞置于含 20% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中 4 小时所得上清的  $\gamma$  计数值。其中, 最小释放值应低于最大释放值的 30%。<sup>51</sup>Cr 释放百分数计算公式为: [(样本 cpm-最小释放 cpm)/(最大释放 cpm-最小释放 cpm)]  $\times$  100%。  
25

<sup>51</sup>Cr 释放试验结果表明: 人 PBMC 体外培养、经累次刺激诱导产生并扩大抗原特异性效应 CTL 细胞的数量, 并做对 HepG2.2.15 细胞、肽抗原预包被的 T2 细胞和 E6 细胞的细胞毒杀伤试验, 结果受试药物诱导的 T 淋巴细胞均能够特异性杀伤肽预包被的 T2 细胞、E 细胞和  
30 HepG2.2.15, 靶细胞特异性溶破率可达 62.8%。

52  
实施例 50.  $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)-$

$CO, CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7CO, KSSQYIKANSKFIGITEGGGDPRVRGLY$   
之 ELISPOT 法检测细胞毒活性

人 PBMC, 经首次刺激 6 天后, 作为待测细胞。ELISPOT 96 孔细胞培养板用 IFN- $\gamma$  包被抗体预包被过夜, 每孔设 3 个复孔, 用含 5% 小牛血清的 RPMI1640 室温封闭 1 小时, 空干后, 加入待测细胞 ( $5 \times 10^4$  细胞/100 $\mu$ l/孔, 含 RPMI1640 培养基、10% 小牛血清、100  $\mu$ /ml 青链霉素、1 $\mu$ g/ml 肽), 其中以未刺激的正常 PBMC 为阴性对照, 培养 15 小时后, 洗涤 6 次, 空干板, 加生物素标记的检测抗体, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时, 再次洗涤, 空干后, 加底物显色。在倒置显微镜下观察、计数斑点数目。结果证明: 本品在 0.01nmol--20nmol 剂量范围内以剂量依赖性方式诱导细胞毒反应。

实施例 51.  $CH_3(CH_2)_{16}COKSSPADREAAALLDYQGMLPVGGGDPRVRGLYFPA$  诱导的 HBV 抗原抑制试验:

24 孔细胞培养板, HepG2.2.1.5 细胞单层培养, 加入无毒浓度以下 2 倍稀释的 7 个浓度药物激活的 PBMC, 按效靶比 10:1, 同时设正常对照和药物对照。培养第 3、5、7、10、14 天, 取上清, 测定 HBsAg、HBeAg。结果表明: 本品在 0.01nmol--20nmol 剂量范围内以剂量依赖性方式抑制 HBsAg、HBeAg 的浓度。

实施例 52.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAALLCLIFLLVGGGDPRVRGLYFPA$  诱导急性乙型肝炎病人 PBMC 之淋巴细胞增殖实验

25 无菌取急性肝炎恢复期病人和的抗凝外周血, 常规 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC, 用 RPMI1640 培养基 (含 10% 小牛血清、100u/ml 青链霉素、L-谷氨酰胺), 在 24 孔细胞培养板中体外培养, 细胞浓度为  $10^6$ /ml。设空白对照组、试验组、Pre-S (2) 对照组, 分别加 IL-2 (30IU/ml) 和受试药物 (0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml), 继续培养 6 天后, 再用相同剂量的 IL-2 和受试药物同剂量下再次刺激 1 次, 并加 <sup>3</sup>H-TdR (1 $\mu$ Ci/ml), 继续培养 18h 后收集细胞, 液闪检测。结果表明: 在 0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml 剂量范围内, 本品以剂量

依赖方式刺激急性肝炎恢复期病人 PBMC 增殖。

实施例 53.  $CH_3(CH_2)_{10}CO$  KSSPADREGGSLNFLGGTTVSSSDPRVRGLYFPA 诱导的肝炎病人 PBMC 之淋巴细胞极化分析

5 设急慢性肝炎空白对照组、急肝含受试药物组、慢肝受试药物组，用 Endogen 试剂盒或 EELISPOT 法检测 Th1/Th2 极化情况。结果：ELISA 法检测病人 PBMC 的培养上清中 IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  等细胞因子浓度及变化情况，结果表明，Pre-S2 可诱导较强的 Th2 型的 T 细胞转化，但基本不能诱导 T 淋巴细胞向 Th1 型转化；受试药物能够诱导 T 淋巴  
10 细胞向 Th1、Th2 型转化，以 Th1 型转化最为明显。

实施例 54.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPVS VGGGDPRVRGLYFPA$  诱导肝炎病人 PBMC 之淋巴细胞的 HBV 特异性效应 CTL 的产生及细胞毒活性  
15 检测

设急慢性肝炎空白对照组、急肝受试药物组、慢肝受试药物组，病人 PBMC 体外培养、经累次刺激诱导产生并扩大抗原特异性效应 CTL 细胞的数量，并做对肽预包被的 T2、E6 细胞和 HepG2.2.15 细胞的细胞毒杀伤试验，结果受试药物诱导的 T 淋巴细胞均能够特异性杀伤上述三种靶细胞系，对急肝恢复期病人 PBMC 而言，靶细胞特异性溶破率可达 68.6%。而慢性肝炎病人 PBMC，靶细胞特异性溶破率略低，可达 42.6%。  
20

实施例 55.

25  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPVS VGGGDPRVRGLYFPA$  诱导乙型肝炎病人 ELISPOT 法检测细胞毒活性：

人 PBMC，经首次刺激 6 天后，作为待测细胞。ELISPOT 96 孔细胞培养板用 IFN- $\gamma$  包被抗体预包被过夜，每孔设 3 个复孔，用含 5% 小牛血清的 RPMI1640 室温封闭 1 小时，空干后，加入待测细胞 ( $5 \times 10^4$   
30 细胞/100ul/孔，含 RPMI1640 培养基、10% 小牛血清、100  $\mu$ /ml 青链霉素、1ug/ml 肽)，其中以未刺激的正常 PBMC 为阴性对照，培养 15 小时后，洗涤 6 次，空干板，加生物素标记的检测抗体，于 37℃ 温育 1 小

时，再次洗涤，空干后，加底物显色。在倒置显微镜下观察、计数斑点数目。结果证明： $\epsilon$ -PA30 在 0.01nmol—20nmol 剂量范围内以剂量依赖性方式诱导细胞毒反应。

5 实施例 56.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$  在 HBV 转基因小鼠诱导 Th1 极化

10 采用 HBV-DNA 转基因小鼠 (ayw 型 HBV 全基因 (1.3Kb) 转染昆明种小鼠)。将动物随机分组，每组 10 只，于双侧腋下和后脚掌皮下注射，按 10、100、1000U/鼠的 3 个剂量给药，每周加强免疫一次，共 3 次。设 IFN- $\alpha$  2b (15000U/鼠) 为阳性对照药、设生理盐水为阴性对照药。给药前、最后一次给药结束后 10、20、30 天。给药结束后 30 天，取小鼠脾脏，分离脾脏淋巴细胞，用试品 10ng/ml 体外刺激 3 天，取上清，用 ELISA 法检测培养上清中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4 等细胞因子  
15 的分泌情况，分析受试药物体内诱导 T 细胞 Th1/Th2 型极化的功能。结果可检测到较强的 IFN- $\gamma$  分泌；IL-4 的检测未见明显的剂量-效应关系。

实施例 57.

20  $CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$  在 HBV 转基因小鼠诱导 CTL 活性

采用 HBV-DNA 转基因小鼠 (ayw 型 HBV 全基因 (1.3Kb) 转染昆明种小鼠)。将动物随机分组，每组 15 只，于双侧腋下和后脚掌皮下注射，按 10、100、1000U/鼠的 3 个剂量给药，每周加强免疫一次，共 3  
25 次。设 IFN- $\alpha$  2b (15000U/鼠) 为阳性对照药、设生理盐水为阴性对照药。给药前、最后一次给药结束后 10、20、30 天。给药结束后 30 天，取小鼠脾脏，分离脾脏淋巴细胞，用试品 10ng/ml 体外刺激 3 天，用 ELI-SPOT 法检测 IFN- $\gamma$  分泌细胞在外周血淋巴细胞中的表达频率。结果表明，在结束免疫后第 30 天，随着原免疫剂量的升高，外周血淋  
30 巴细胞中 IFN- $\gamma$  分泌细胞的表达频率升高，其中 100、1000U/鼠的免疫剂量，体内诱导外周血淋巴细胞中 IFN- $\gamma$  分泌细胞的表达频率升高明显，最高可检测到  $3660 \pm$  IFN- $\gamma$  分泌细胞/ $10^6$ PBMC。

实施例 58.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$  在 HBV 转基因小鼠抑制病毒表面抗原 (HBsAg)

采用 HBV-DNA 转基因小鼠 (ayw 型 HBV 全基因 (1.3Kb) 转染昆明种小鼠)。将动物随机分组, 每组 15 只, 于双侧腋下和后脚掌皮下注射, 按 10、100、1000U/鼠的 3 个剂量给药, 每周加强免疫一次, 共 3 次。设 IFN- $\alpha$ 2b (15000U/鼠) 为阳性对照药、设生理盐水为阴性对照药。给药前、最后一次给药结束后 10、20、30 天。于三次免疫结束后的第 10、20、30 天, 取血, 分离血清, 分别用 ELISA 法血清中 HBsAg。结果表明血清 HBsAg 明显降低, 且呈剂量依赖性和时间依赖性。

实施例 59.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$  在 HBV 转基因小鼠抑制病毒复制

采用 HBV-DNA 转基因小鼠 (ayw 型 HBV 全基因 (1.3Kb) 转染昆明种小鼠)。将动物随机分组, 每组 15 只, 于双侧腋下和后脚掌皮下注射, 按 10、100、1000U/鼠的 3 个剂量给药, 每周加强免疫一次, 共 3 次。设 IFN- $\alpha$ 2b (15000U/鼠) 为阳性对照药、设生理盐水为阴性对照药。给药前、最后一次给药结束后 10、20、30 天。于三次免疫结束后的第 10、20、30 天, 取血, 分离血清, 分别用定量 PCR 法检测血清中 HBV DNA 拷贝数。结果表明血清 HBV DNA 拷贝数明显降低, 且呈剂量依赖性和时间依赖性。

实施例 60.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFPSVGGGDPRVRGLYFPA$  的等电点测定

采用载体两性电解质 PH 梯度等电聚胶。预处理: 8 N 尿素和 2% TritonX-114, 同时在聚丙烯酰胺凝胶中也要加入相应浓度的尿素和 0.5% 的 TritonX-114。染色采用常规的考马斯亮兰染色。结果表明: 本品等电点为 pH7.2。

实施例 61.

76:

$CH_3(CH_2)_{-14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  的紫外光谱测定

采用紫外分光光度计, 对乙型肝炎治疗性多肽  $\epsilon$ -PA44 半成品进行紫外光谱扫描, 并确定最大紫外吸收值对应的波长。将送检样品稀释至仪器的测定范围内, 取样进行紫外光谱扫描, 扫描波长为: 190nm-500nm; 空白对照为: 50%乙醇。结果表明: 其紫外光谱最大特征吸收峰在

实施例 62.

10  $CH_3(CH_2)_{-14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  的肽图测定

称重 1mg 胰蛋白酶于 1.5ml 离心管, 并溶于 0.1M  $NaHCO_3$  中, 终浓度为 1mg/ml, 即为胰蛋白酶储液。加 10  $\mu$ l 胰蛋白酶液于  $\epsilon$  PA44 样品管。盖紧离心管, 反应混合物于 37℃ 孵育 2 小时。在消化反应正在进行的同  
15 时, 置剩余的胰蛋白酶储液于冰上。2 小时后补加 10  $\mu$ l 胰蛋白酶于消化混合物。盖紧离心管, 再继续于 37℃ 下孵育 4.5 小时。反应结束时加 10  $\mu$ l TFA 终止反应。直接取样 20  $\mu$ l 进行 RP-HPLC 分析 [HP 1100 高效液相色谱仪; 色谱柱: Waters Symmetry  $C_{18}$  分析柱 (粒度 5  $\mu$ m, 孔径 100Å 柱直径 3.9mm 柱长 150mm)]。

20 结果获得其特征性肽图。

实施例 63.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  纯度分析 (一)

25 采用有效的分子量线性范围为 1000---80000 的高效凝胶分析柱对分子量约为 4947.37 道尔顿的  $\epsilon$  PA44 纯度进行分析, 以 214nm 紫外波长检测肽键的吸收, 根据面积归一化法积分计算本品主峰的百分纯度。仪器与色谱条件: Waters Delta 600 高效液相色谱仪; Waters Millennium <sup>32</sup> 色谱软件; Waters Ultrahydrogel 250 高分辨凝胶分析  
30 柱 (粒度 6  $\mu$ m, 孔径 250 Å, 柱直径 7.8mm 柱长 300 mm);  $CH_3CN$  (乙腈, HPLC 级, 浙江临海); TFA (三氟乙酸, HPLC 级, 美国 Sigma 公司)。流动相选用 40% $CH_3CN$  0.1% TFA; 浓缩后的半成品取样 2  $\mu$ l 上样; 流速:

0.5ml/min; 紫外检测波长: 214nm。结果表明: 该品纯度在 99.8%。

实施例 64.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  纯度

5 分析 (二)

采用梯度反相高压液相色谱的方法分离本品, 以 214nm 紫外波长检测肽键的吸收, 根据面积归一化法积分计算主峰  $\epsilon$  PA44 的百分纯度。仪器与色谱条件: HP 1100 高效液相色谱仪; 色谱柱: Waters Symmetry  $C_{18}$  分析柱 (粒度  $5\mu m$ , 孔径  $100\text{\AA}$  柱直径  $3.9mm$  柱长  $150mm$ ) 及保护柱 (粒度  $5\mu m$ , 孔径  $100\text{\AA}$  柱直径  $3.9mm$  柱长  $20mm$ );  $CH_3CN$  (乙腈, HPLC 级, 浙江临海); TFA (三氟乙酸, HPLC 级, 美国 Sigma 公司)。流动相 A 相为  $100\% H_2O-0.1\% TFA$ ; B 相为  $100\% CH_3CN-0.1\% TFA$ ; 线性梯度:  $10\%B \sim 70\%B$   $30min$ ; 流速:  $1ml/min$ ; 紫外检测波长:  $214nm$ 。结果表明: 本品纯度为:  $99.9\%$ 。

15

实施例 65.

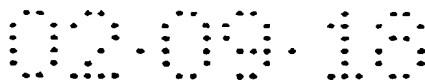
$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  含量测定

20 采用外标法和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分析技术, 测定组分收集液、半成品、浓缩液及其脂质体浓缩液等样品中本品的含量。

将送检样品稀释至本品标准曲线的定量范围内, 取样进行 RP-HPLC 分析, 根据建立的定量标准曲线线性回归方程:  $Y(\text{峰面积}) = 12.362 X(\text{浓度}) + 80.702$  和样品的稀释倍数, 计算送检样品的本品含量。

25 仪器与色谱条件: HP 1100 高效液相色谱仪; 色谱柱: Waters Symmetry  $C_{18}$  分析柱 (粒度  $5\mu m$ , 孔径  $100\text{\AA}$ , 柱直径  $3.9mm$ , 柱长  $150mm$ ) 及保护柱 (粒度  $5\mu m$ , 孔径  $100\text{\AA}$ , 柱直径  $3.9mm$ , 柱长  $20mm$ ); 柱温:  $25^\circ C$ ;  $CH_3CN$  (乙腈, HPLC 级, 浙江临海); TFA (三氟乙酸, HPLC 级, 美国 Sigma 公司)。流动相 A:  $100\% H_2O-0.1\% TFA$ ; 流动相 B:  $100\% CH_3CN-0.1\% TFA$ ; 线性梯度:  $30\% \sim 60\%B$   $15min$ ; 流速:  $1ml/min$ ; 30 紫外检测波长:  $214nm$ 。结果表明: 本品含量  $4.5mg/ml$ 。

实施例 66.



58

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  分子量测定

运用电喷雾质谱 (ESI-MS) 软电离使多肽及蛋白质分子带多个电荷, 形成不同质量电荷比, 从而根据相邻两个峰的质荷比联立方程 ( $n = m_1 - H / m_2 - m_1$ ) 得到的所带电荷数来达到准确测定  $\epsilon$  PA44 分子量的目的。仪器与质谱条件: PE ABI 2000 质谱仪; PE SCIEX Analyst 1.0b3 质谱分析软件; 扫描 Q1 正离子, GAS1: 20 GAS2: 0 CUR: 20 TEM: 50°C CAD: 0 IS: 5500 NC: 2 DP: 30 FP: 350 EP: -10 DF: 0 CEM: 1800。检测结果: 4929.12u, 与理论分子量相符。

10

实施例 67.

$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  脂质体的粒径分布测定

采用激光粒度分析仪 (Laser Particle Sizer "Analysette 22"; 德国 FRITSCH)、用微量池 (德国 FRITSCH) 检测  $\epsilon$  PA 4 4 脂质体的粒径分布。检测范围: 0.1  $\mu m$  - 100.25  $\mu m$ , 分辨率: 62 道 (9 mm/38 mm)。将冻干  $\epsilon$  PA 4 4 脂质体成品随机抽样, 用水溶解、稀释、混允后检测。结果表明: 本品 D50 为 0.25  $\mu m$ , D90 为 0.72  $\mu m$ , 跨距小于 3。

20 

实施例 68.

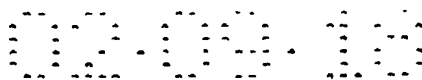
$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFPSDFFPVGGGDPRVRGLYFPA$  半成品的效价/比活性测定

将送检的原液半成品, 稀释至本品效价测定的范围内, 进行酶联板的包被、封闭、酶标抗体的结合及显色。在酶标仪 450 nm 下检测吸光值 (A450nm), 并与本品参考品比较, 测定萃取样品中  $\epsilon$  PA 4 4 的效价, 计算出本品半成品的比活性。

将本品参考品用 50% 乙醇稀释 10 倍, 再进行倍比稀释; 分别吸取 100  $\mu l$  稀释液加入 96 孔酶标板, 均重复 3 孔, 置 4°C 冰箱包被 20-24 小时。  $\epsilon$  PA 4 4 原液按照参考品的操作进行稀释和包被。阴性对照孔: 加入 50% 乙醇 100  $\mu l$ 。包被结束后, 每孔加 1% 小牛血清 200  $\mu l$ , 放置 4°C 冰箱封闭 2 小时。将酶联板空干, 每孔加入酶标抗体 80  $\mu l$ , 置于 37°C 孵育 40 分钟; 将酶联板用洗液清洗 4 次, 空干后每孔加入底



49



物液 A、B 各 50  $\mu$ l，置 37℃避光显色 15 分钟；每孔加终止液 50  $\mu$ l。  
在 550 型酶标检测仪上测定  $A_{450nm}$ ，根据  $\epsilon$  P A 4 4 参考品的半效值  
(半数最大吸光值)，采用程序或直线回归方法处理，分别计算参考品  
和样品的半效稀释倍数；将其代入以下面公式，计算出待检样品效价  
5 和本品成品比活性。

$$A = 2^{(na - ne)} \quad B = \frac{ma}{me} ; \quad SA = \frac{A}{C}$$

检测结果表明：本品比活性为 13985.31U/mg；每瓶效价为 4085.53U。

### 实施例 69.

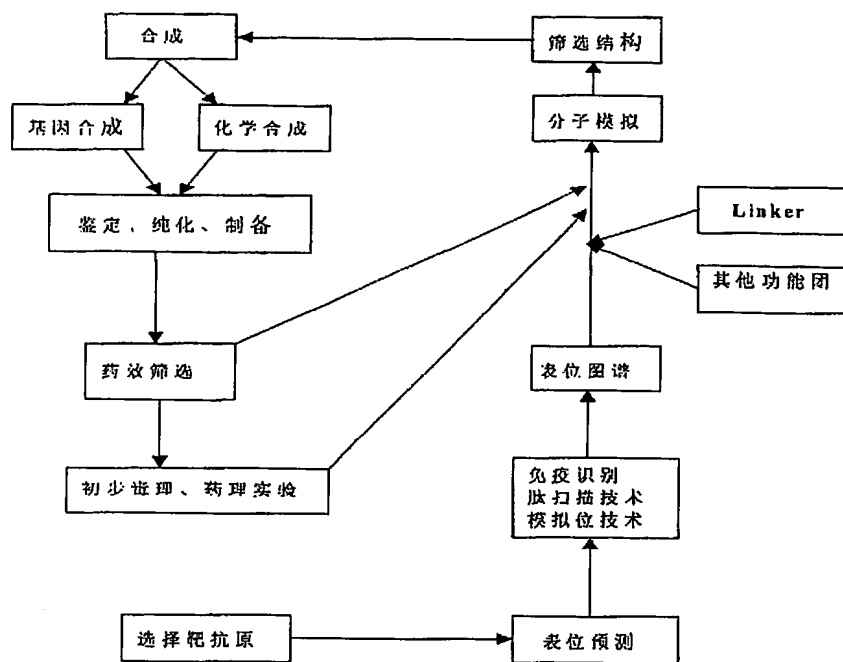
$CH_3(CH_2)_{14}COKSSQYIKANSKFIGITEAAAFLPSDFPSPVGGDPRVRGLYFPA$  脂

#### 10 质体效价/比活性测定

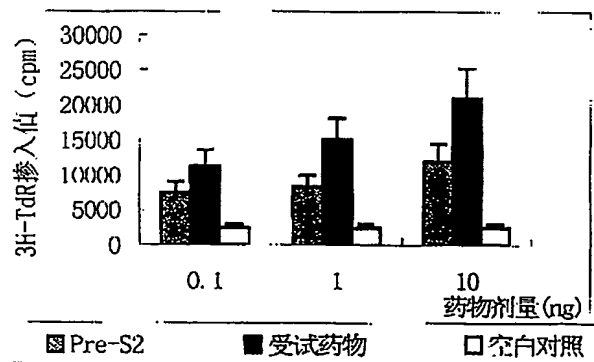
经洗涤、离心、萃取和干燥处理，再溶解并取样进行 RP-HPLC 分  
析测定  $\epsilon$  P A 4 4 的含量。依据测定的含量将样品稀释至效价测定的  
范围内，进行酶联板的包被、封闭、酶标抗体的结合及显色。在酶标  
仪 450 nm 下检测吸光值 ( $A_{450nm}$ )，并与本品参考品比较，测定萃取样  
15 品中本品的效价，计算出本品成品的比活性。将参考品用 50  $\square$  乙醇稀  
释 10 倍，再进行倍比稀释；分别吸取 100  $\mu$ l 稀释液加入 96 孔酶标板，  
均重复 3 孔，置 4℃冰箱包被 20-24 小时。本品成品经上述预处理样品，  
按照本品参考品的操作进行稀释和包被。阴性对照孔：加入 50  $\square$  乙醇  
100  $\mu$ l。包被结束，每孔加 1  $\square$  小牛血清 200  $\mu$ l，放置 4℃冰箱封闭 2  
20 小时。将酶联板空干，每孔加入酶标抗体 80  $\mu$ l，置于 37℃孵育 40 分  
钟；将酶联板用洗液清洗 4 次，空干后每孔加底物液 A、B 各 50  $\mu$ l，  
置 37℃显色 15 分钟；每孔加终止液 50  $\mu$ l。在 550 型酶联仪上测定  
 $A_{450nm}$ 。根据  $\epsilon$  P A 4 4 参考品的半效值 (半数最大吸光值)，采用程序  
或直线回归方法处理，分别计算本品参考品和样品的半效稀释倍数；  
25 将其代入以下面公式，计算出待检样品效价和本品成品比活性。

$$A = 2^{(na - ne)} \quad B = \frac{ma}{me} ; \quad SA = \frac{A}{C}$$

检测结果表明：本品比活性为 14173.51U/mg；每瓶效价为 4177.78U。

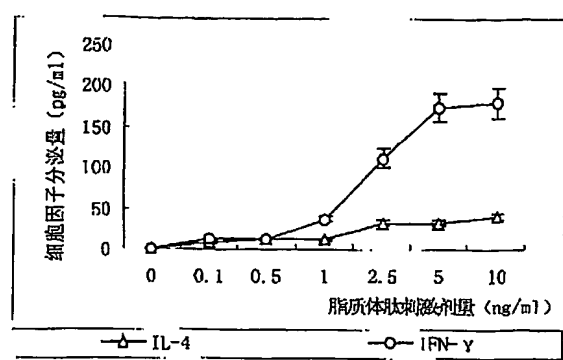
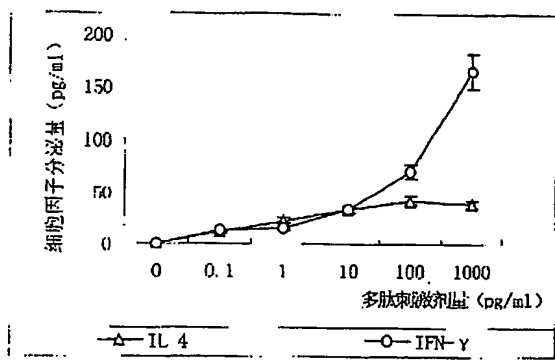


附图 1、基于表位的疫苗设计路线 (EBVD) 示意



附图 2: 诱导淋巴细胞增殖效应图

67

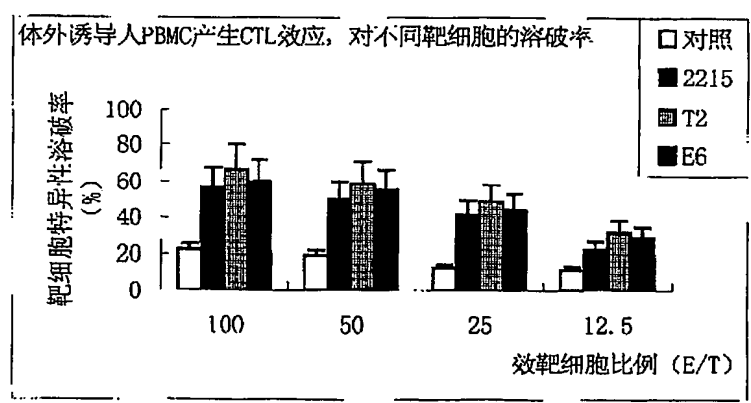


(A)

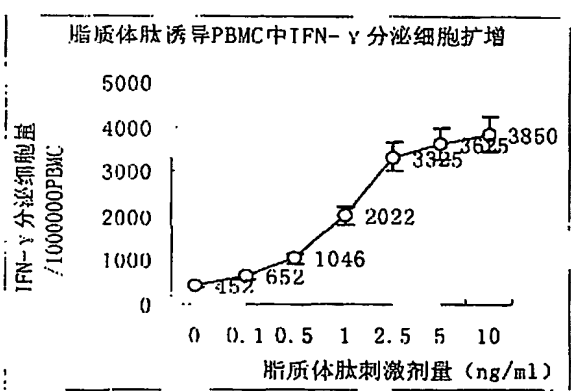
(B)

附图 3: 诱导 Th1 极化的效应图 (包括图 A 和 B)

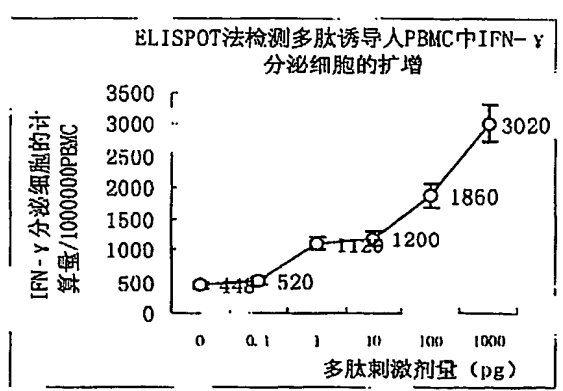
5



(A)

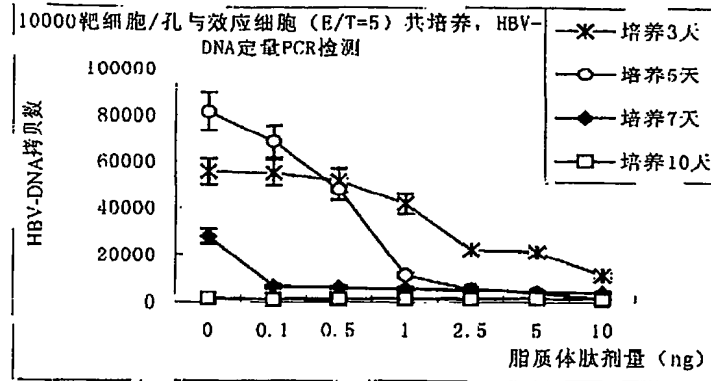


(B)

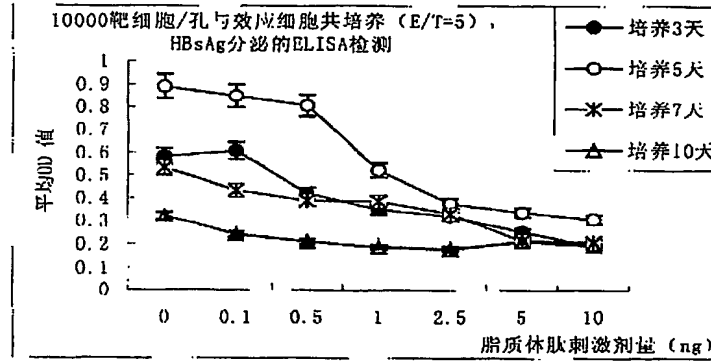


(C)

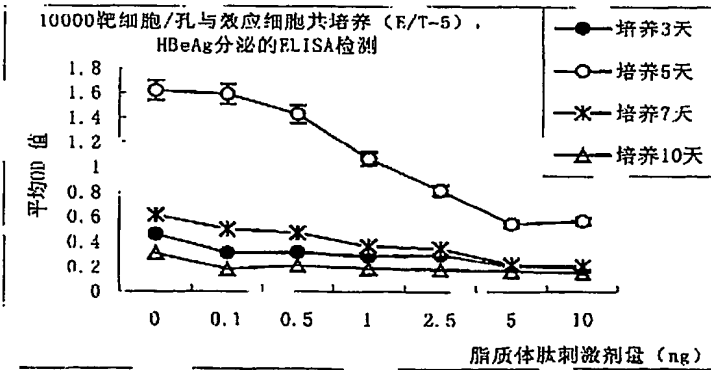
附图 4: 诱导细胞毒效应图 (包括图 A、B、C)



A



B



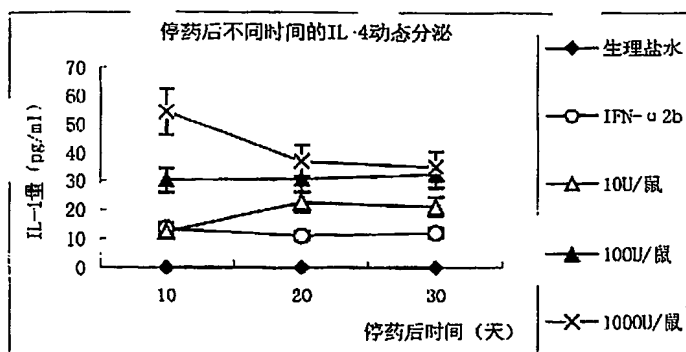
C

附图 5: 抗病毒效应图 (包括图 A、B、C)

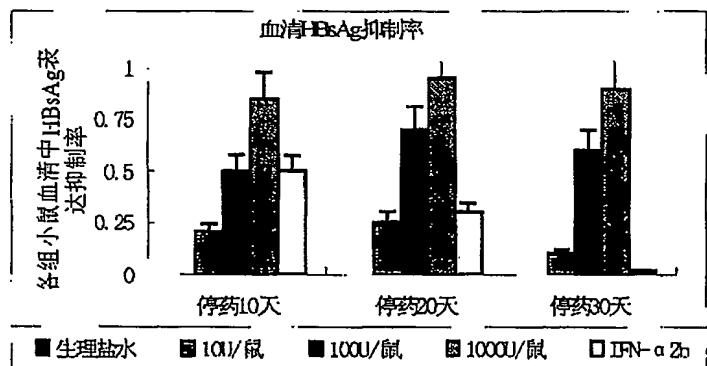
附图 6: (包括图 A、B、C、D、E 和 F)

5

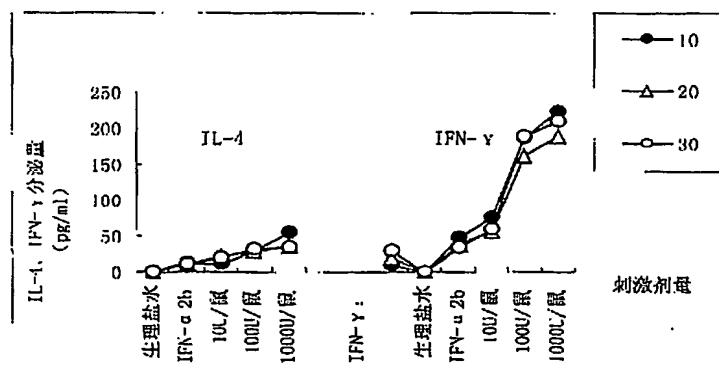
(A)



(B)



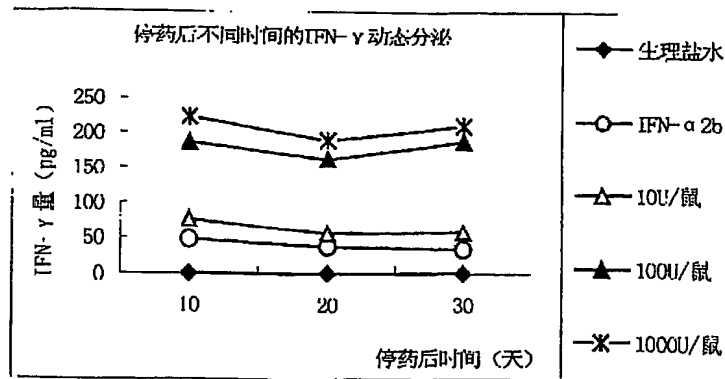
(C)



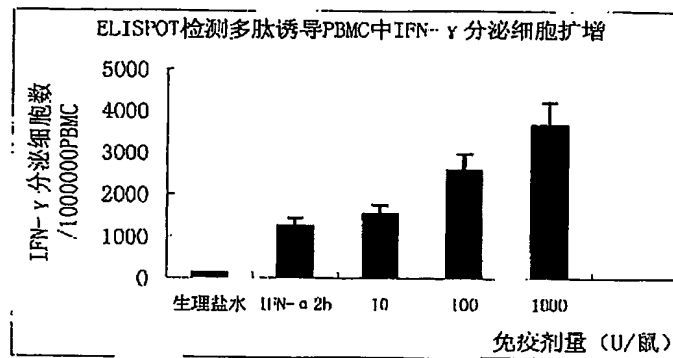
05-00-15

6p

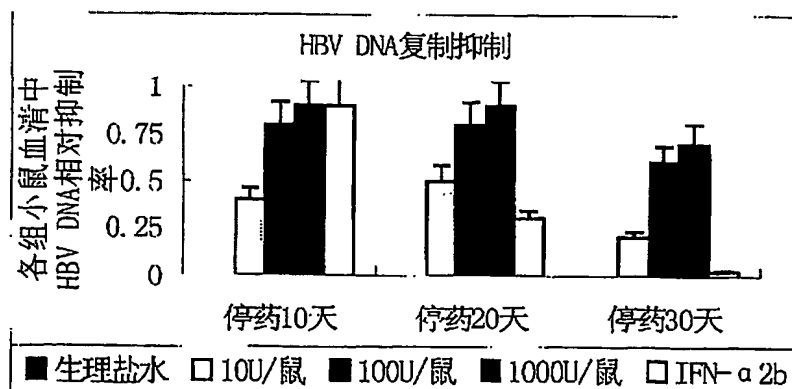
(D)



(E)



(F)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**